

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003232

International filing date: 21 February 2005 (21.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-045489
Filing date: 20 February 2004 (20.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

21.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 2 月 2 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 4 5 4 8 9
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 4 - 0 4 5 4 8 9]

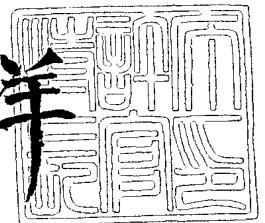
出 願 人 財団法人 東京都医学研究機構
Applicant(s): 東レ株式会社

2 0 0 5 年 3 月 2 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川

洋



出証番号 出証特 2 0 0 5 - 3 0 2 6 2 1 8

【書類名】 特許願
【整理番号】 P04-0110
【提出日】 平成16年 2月20日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 7/00
C12N 15/00

【発明者】
【住所又は居所】 東京都板橋区成増 3丁目 37番 1号 302号室
【氏名】 脇田 隆字

【発明者】
【住所又は居所】 愛知県名古屋市瑞穂区松月町 1丁目 41番地 エミネンス石川橋
206号
【氏名】 加藤 孝宣

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市中原区新城 3丁目 13番 5号 テラス新城 303
号室
【氏名】 伊達 朋子

【発明者】
【住所又は居所】 東京都府中市本宿町 1丁目 32番 1号 サンライズヒル 7-20
2号室
【氏名】 宮本 道子

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1111番地 東レ株式会社 基礎研究所
医薬研究所内
【氏名】 田邊 純一

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1111番地 東レ株式会社 基礎研究所
医薬研究所内
【氏名】 曾根 三郎

【特許出願人】
【識別番号】 591063394
【氏名又は名称】 財団法人 東京都医学研究機構

【特許出願人】
【識別番号】 000003159
【氏名又は名称】 東レ株式会社

【代理人】
【識別番号】 100091096
【弁理士】
【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】
【識別番号】 100096183
【弁理士】
【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】
【識別番号】 100118773
【弁理士】
【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100119183

【弁理士】

【氏名又は名称】 松任谷 優子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAの、5'非翻訳領域、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域と、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子及び／又は少なくとも1つのリポーター遺伝子と、少なくとも1つのIRES配列と、を含む塩基配列からなる、レプリコンRNA。

【請求項 2】

前記塩基配列が、前記の5'非翻訳領域、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子及び／又は少なくとも1つのリポーター遺伝子、少なくとも1つのIRES配列、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域を、5'から3'方向へこの順番で含む、請求項1記載のレプリコンRNA。

【請求項 3】

遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAが、配列番号12に示す塩基配列からなるRNAである、請求項1又は2記載のレプリコンRNA。

【請求項 4】

5'非翻訳領域が配列番号1に示す塩基配列からなり、coreタンパク質コード配列が配列番号2に示す塩基配列からなり、E1タンパク質コード配列が配列番号3に示す塩基配列からなり、E2タンパク質コード配列が配列番号4に示す塩基配列からなり、NS2タンパク質コード配列が配列番号5に示す塩基配列からなり、NS3タンパク質コード配列が配列番号6に示す塩基配列からなり、NS4Aタンパク質コード配列が配列番号7に示す塩基配列からなり、NS4Bタンパク質コード配列が配列番号8に示す塩基配列からなり、NS5Aタンパク質コード配列が配列番号9に示す塩基配列からなり、NS5Bタンパク質コード配列が配列番号10に示す塩基配列からなり、3'非翻訳領域が配列番号11に示す塩基配列からなる、請求項1～3のいずれか1項記載のレプリコンRNA。

【請求項 5】

以下の(a)又は(b)のRNAからなるレプリコンRNA。

(a) 配列番号13に示す塩基配列からなるRNA。

(b) 配列番号13に示す塩基配列において1～100個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列からなるRNAであって、自律複製能及びウイルス粒子産生能を有するRNA。

【請求項 6】

請求項1～5のいずれか1項記載のレプリコンRNAを細胞に導入することを含む、該レプリコンRNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞を製造する方法。

【請求項 7】

細胞が増殖性細胞である、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

細胞が真核細胞である、請求項6又は7記載の方法。

【請求項 9】

真核細胞がヒト肝由来細胞、ヒト子宮頸由来細胞、又はヒト胎児腎由来細胞である、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

真核細胞がHuh7細胞、HepG2細胞、IMY-N9細胞、HeLa細胞、又は293細胞である、請求項8記載の方法。

【請求項 11】

請求項6～10のいずれか1項記載の方法により製造される、レプリコンRNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞。

【請求項 12】

請求項 1 1 記載の細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、C型肝炎ウイルス粒子の製造方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 記載の方法により製造される、C型肝炎ウイルス粒子。

【請求項 1 4】

請求項 1 1 記載の細胞を培養し、培養物中のウイルス粒子を他の細胞に感染させることを含む、C型肝炎ウイルス感染細胞を製造する方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 記載の方法によって製造される、C型肝炎ウイルス感染細胞。

【請求項 1 6】

被験物質の存在下で、下記(a)～(c)：

(a) 請求項 1 1 記載の細胞

(b) 請求項 1 5 記載のC型肝炎ウイルス感染細胞、並びに

(c) 請求項 1 3 記載のC型肝炎ウイルス粒子及びC型肝炎ウイルス感受性細胞、
のうちの少なくとも1つを培養し、得られる培養物中のレプリコンRNA又はウイルス粒子
を検出することを含む、抗C型肝炎ウイルス物質をスクリーニングする方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 3 記載のC型肝炎ウイルス粒子又はその一部分を抗原として使用して、C型肝炎ワクチンを製造する方法。

【請求項 1 8】

請求項 1～5 のいずれか 1 項記載のレプリコンRNAを使用して、遺伝子治療のための肝細胞指向性ウイルスベクターを製造する方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 に記載の方法により製造される、肝細胞指向性ウイルスベクター。

【請求項 2 0】

外来遺伝子をコードするRNAを請求項 1～5 のいずれか 1 項記載のレプリコンRNA中に挿入し、それを細胞中に導入することを含む、該細胞内で外来遺伝子を複製及び／又は発現させる方法。

【請求項 2 1】

配列番号 1 2 に示す塩基配列からなるRNAを細胞に導入することを含む、該RNAを複製し
かつウイルス粒子を産生する細胞を製造する方法。

【請求項 2 2】

配列番号 1 2 に示す塩基配列からなるRNAを細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、C型肝炎ウイルス粒子の製造方法。

【請求項 2 3】

細胞が増殖性細胞である、請求項 2 1 又は 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

配列番号 1 2 に示す塩基配列からなるRNAに外来遺伝子をコードするRNAを挿入し、それを細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、外来遺伝子
を含有するウイルスベクターを製造する方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】ヒトC型肝炎ウイルスの全長ゲノムを含む核酸構築物及び該核酸構築物を導入した組換え全長ウイルスゲノム複製細胞、並びにヒトC型肝炎ウイルス粒子の作製方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、C型肝炎ウイルスの全長ゲノムを含む核酸構築物、C型肝炎ウイルス粒子のin vitroでの作製方法、及び作製したC型肝炎ウイルス粒子の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

C型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus、HCV) は、フラビウイルス科に属する、一本鎖の(+)鎖センスRNAをゲノムとするウイルスであり、C型肝炎の原因となることが知られている。

【0003】

HCVは持続的に感染することにより慢性肝炎を引き起こす。現在、世界的規模で認められる慢性肝炎の主たる原因がHCV持続感染である。実際、持続感染者の50%程度が慢性肝炎を発症し、そのうち約20%の患者が10年～20年を経て肝硬変に移行し、さらにその一部は肝癌といった致死的な病態へと進展する。

【0004】

C型肝炎に対する現在の主な治療は、インターフェロン α 、インターフェロン β 、及びインターフェロン α とプリンヌクレオシド誘導体であるリバビリンとの併用療法により行われている。しかしながら、これらの治療を行っても、全治療者の約60%に治療効果が認められるだけであり、効果が出た後に治療を中止すると半分以上の患者が再燃する。

【0005】

工業国において罹患率が高く、最終的に深刻な結果を招き、かつ現在は原因治療法が存在しないC型肝炎に対する効果的な治療薬又は予防薬の開発は重要な目標である。そのため、HCV特異的な化学療法、ワクチン療法の発展が切望されている。抗HCV薬開発のターゲットとしては、HCVの複製抑制やHCVの細胞感染の抑制が考えられる。

【0006】

最近になって、HCV由来の自律複製能を有するRNAとして、HCVサブゲノムRNAレプリコンシステムが作製された(特許文献1、2及び3、非特許文献1～4)。HCVサブゲノムRNAレプリコンシステムは、HCVゲノムの構造遺伝子を取り除いて代わりに選択薬剤マーカー遺伝子を挿入したHCVレプリコンRNAを作製し、そのレプリコンRNAを培養細胞内に導入し、細胞内でレプリコンRNAを自律的に複製させるシステムである。これにより、培養細胞を用いてHCVの複製機構を解析することが可能になったが、これはHCVウイルスの増殖複製過程におけるウイルスRNA複製のみを評価することが可能な実験系であり、HCVウイルス粒子の感染細胞内での形成と細胞外への放出、さらに新たな細胞への感染という過程は解析できない。

【0007】

現在、HCVウイルス粒子の形成と細胞外への放出、さらに新たな細胞への感染という過程を評価する方法としては、チンパンジーなどの動物を用いた実験系しかない(非特許文献5)。しかしながら、動物という生体をそのまま用いた実験系は、煩雑で解析が極めて困難である。したがって、HCVウイルス粒子の感染細胞内での形成と細胞外への放出、さらに新たな細胞への感染という過程を解析および、これらの過程の阻害を作用メカニズムとした抗HCV薬を作製するには、これらの過程を再現できる極めて単純化した実験系、すなわち、培養実験系でのHCVウイルス粒子の作製系を構築する必要がある。

【0008】

また、細胞培養系を用いて安定してHCVウイルス粒子を供給可能になれば、ウイルスを弱毒化したり、分子生物学的手法を用いて非感染性のHCVウイルスを作製したりして、そ

れをワクチンに用いることができる。

【0009】

【特許文献1】特開2001-17187号公報

【特許文献2】国際出願PCT/JPO3/15038

【特許文献3】特願2003-329082

【非特許文献1】Lohmann et al., Science, (1999) 285, p. 110-113

【非特許文献2】Blight et al., Science, (2000) 290, p. 1972-1974

【非特許文献3】Friebe et al., J. Virol., (2001) 75(24): p. 12047-12057

【非特許文献4】Ikeda et al., J. Virol., (2002) 76(6): p. 2997-3006

【非特許文献5】Kolykhalov et al., Science, (1997) 277, p. 570-574

【非特許文献6】Kato et al., Gastroenterology, (2003) 125, p. 1808-1817

【非特許文献7】Yanagi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., (1997) 96(16): p. 8738-87

43

【特許文献8】Okamoto et al., J. Gen. Virol., (1991) 73, p. 2697-26704

【非特許文献9】Aoyagi et al., J. Clin. Microbiol., (1999) 37(6): p. 1802-180

8

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、これまで成功していない、HCV全長ゲノム配列を含むRNAを効率良く複製する方法、及び全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを含有するHCVウイルス粒子を細胞培養系により製造する方法、を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、HCVウイルス粒子を細胞培養系で作製する方法を開発した。すなわち、本発明は以下の通りである。

【0012】

[1] 遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAの、5'非翻訳領域、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域と、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子及び／又は少なくとも1つのリポーター遺伝子と、少なくとも1つのIRES配列と、を含む塩基配列からなる、レプリコンRNA。

【0013】

このレプリコンRNAにおいては、好ましくは、前記塩基配列が、前記の5'非翻訳領域、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子及び／又は少なくとも1つのリポーター遺伝子、少なくとも1つのIRES配列、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域を、5'から3'方向へこの順番で含む。

このレプリコンRNAのより好ましい実施形態では、遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAが、配列番号12に示す塩基配列からなるRNAである。

【0014】

このレプリコンRNAのさらに好ましい実施形態では、5'非翻訳領域が配列番号1に示す塩基配列からなり、coreタンパク質コード配列が配列番号2に示す塩基配列からなり、E1タンパク質コード配列が配列番号3に示す塩基配列からなり、E2タンパク質コード配列が配列番号4に示す塩基配列からなり、NS2タンパク質コード配列が配列番号5に示す塩基配列からなり、NS3タンパク質コード配列が配列番号6に示す塩基配列からなり、NS4Aタンパク質コード配列が配列番号7に示す塩基配列からなり、NS4Bタンパク質コード配列が配列番号8に示す塩基配列からなり、NS5Aタンパク質コード配列が配列番号9に示す塩基

配列からなり、NS5Bタンパク質コード配列が配列番号10に示す塩基配列からなり、3'非翻訳領域が配列番号11に示す塩基配列からなる。

【0015】

[2] 以下の(a)又は(b)のRNAからなるレプリコンRNA。

(a) 配列番号13に示す塩基配列からなるRNA。

(b) 配列番号13に示す塩基配列において1～100個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列からなるRNAであって、自律複製能及びウイルス粒子産生能を有するRNA。

【0016】

[3] 上記[1]又は[2]記載のいずれかのレプリコンRNAを細胞に導入することを含む、該レプリコンRNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞を製造する方法。

この方法では、細胞が増殖性細胞であることが好ましい。あるいは、この方法における細胞は、真核細胞であることが好ましい。

この方法では、好ましくは、真核細胞はヒト肝由来細胞、ヒト子宮頸由来細胞、又はヒト胎児腎由来細胞である。さらに好ましくは、真核細胞がHuh7細胞、HepG2細胞、IMY-N9細胞、HeLa細胞、又は293細胞である。

【0017】

[4] 上記[3]記載の方法により製造される、レプリコンRNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞。

【0018】

[5] 上記[4]記載の細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、C型肝炎ウイルス粒子の製造方法。

【0019】

[6] 上記[5]記載の方法により製造される、C型肝炎ウイルス粒子。

【0020】

[7] 上記[4]記載の細胞を培養し、培養物中のウイルス粒子を他の細胞に感染させることを含む、C型肝炎ウイルス感染細胞を製造する方法。

【0021】

[8] 上記[7]記載の方法によって製造される、C型肝炎ウイルス感染細胞。

【0022】

[9] 被験物質の存在下で、下記(a)～(c)：

(a) 上記[4]記載の細胞

(b) 上記[8]記載のC型肝炎ウイルス感染細胞、並びに

(c) 上記[6]記載のC型肝炎ウイルス粒子及びC型肝炎ウイルス感受性細胞、
のうちの少なくとも1つを培養し、得られる培養物中のレプリコンRNA又はウイルス粒子を検出することを含む、抗C型肝炎ウイルス物質をスクリーニングする方法。

【0023】

[10] 上記[6]記載のC型肝炎ウイルス粒子又はその一部分を抗原として使用して、C型肝炎ワクチンを製造する方法。

【0024】

[11] 上記[1]又は[2]記載のいずれかのレプリコンRNAを使用して、遺伝子治療のための肝細胞指向性ウイルスベクターを製造する方法。

【0025】

[12] 上記[11]に記載の方法により製造される、肝細胞指向性ウイルスベクター。

【0026】

[13] 外来遺伝子をコードするRNAを上記[1]又は[2]記載のいずれかのレプリコンRNA中に挿入し、それを細胞中に導入することを含む、該細胞内で外来遺伝子を複製及び／又は発現させる方法。

【0027】

[14] 配列番号12に示す塩基配列からなるRNAを細胞に導入することを含む、該RNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞を製造する方法。

【0028】

[15] 配列番号 12 に示す塩基配列からなる RNA を細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、C 型肝炎ウイルス粒子の製造方法。

【0029】

[16] 細胞が増殖性細胞である、上記[14]又は[15]記載の方法。

【0030】

[17] 配列番号 12 に示す塩基配列からなる RNA に外来遺伝子をコードする RNA を挿入し、それを細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、外来遺伝子を含むウイルスベクターを製造する方法。

【発明の効果】

【0031】

本発明により、HCV 由来のウイルス粒子を、細胞培養系を用いて作製する方法が提供される。本発明の全長 HCV レプリコン RNA 又は全長 HCV ゲノム RNA を細胞に導入することにより、他の細胞への感染能をもち、全長 HCV レプリコン RNA 又は全長 HCV ゲノム RNA を含有するウイルス粒子を *in vitro* で産生させることができる。また、本発明のレプリコン RNA を用いれば、細胞培養系において HCV の全長ゲノム RNA を含有する RNA を効率よく製造することができる。さらに、本発明の全長 HCV レプリコン RNA 若しくは全長 HCV ゲノム RNA を導入した細胞を用いれば、HCV の複製過程、ウイルス粒子形成過程、又はウイルス粒子の細胞外放出過程に影響を及ぼす各種物質をスクリーニングすることもできる。本発明のウイルス粒子を他の細胞に感染させる系を用いて、ウイルス粒子の細胞への感染に影響を及ぼす各種物質をスクリーニングすることもできる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

以下、本発明について詳細に説明する。

1. 全長 HCV レプリコン RNA

C 型肝炎ウイルス (HCV) のゲノムは、約 9600 ヌクレオチドからなる (+) 鎖の一本鎖 RNA である。このゲノム RNA は、5' 非翻訳領域 (5' NTR 又は 5' UTR とともに表記する)、構造領域と非構造領域とから構成される翻訳領域、及び 3' 非翻訳領域 (3' NTR 又は 3' UTR とともに表記する) からなる。その構造領域には HCV の構造タンパク質がコードされており、非構造領域には複数の非構造タンパク質がコードされている。

【0033】

このような HCV の構造タンパク質 (core、E1、及び E2) と非構造タンパク質 (NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、及び NS5B) は、翻訳領域から一続きのポリプロテインとして翻訳された後、プロテアーゼによる限定分解を受けて遊離、生成される。これらの構造タンパク質及び非構造タンパク質 (すなわち、HCV のウイルスタンパク質) のうち、core はコアタンパク質であり、E1 及び E2 はエンベロープタンパク質である。非構造タンパク質はウイルス自身の複製に関与するタンパク質であり、NS2 はメタロプロテアーゼ活性、NS3 はセリンプロテアーゼ活性 (N 末端側の 3 分の 1) とヘリカーゼ活性 (C 末端側の 3 分の 2) を有することが知られている。さらに、NS4A は NS3 のプロテアーゼ活性に対するコファクターであり、NS5B は RNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を有することも報告されている。

【0034】

本発明者らは、HCV ゲノム RNA を用いて、自律的に複製可能であり、かつウイルス粒子産生能を有するレプリコン RNA を構築した。

【0035】

本明細書では、自律複製能を有しており HCV ゲノム RNA を改変して作製された RNA を、「レプリコン RNA」又は「RNA レプリコン」と称する。本明細書において HCV 由来のレプリコン RNA は、HCV-RNA レプリコンとも称する。本明細書では、HCV ゲノム RNA の全長を含む本発明のレプリコン RNA を、「全長 HCV レプリコン RNA」と呼ぶ。本発明の全長 HCV レプリコン RNA は、ウイルス粒子産生能を有する。

【0036】

本発明の全長HCVレプリコンRNAの好適な実施形態では、C型肝炎ウイルスは、限定するものではないが、遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスであることが好ましい。本発明において、「遺伝子型2aのC型肝炎ウイルス」「遺伝子型2aのHCV」とは、Simmondsら (Simmonds, P. et al, Hepatology, (1994) 10, p. 1321-1324を参照) による国際分類に従って遺伝子型2aと同定されるC型肝炎ウイルスを意味する。本発明における「遺伝子型2aのC型肝炎ウイルス」「遺伝子型2aのHCV」には、天然由来のHCVゲノムRNAを有するウイルスだけでなく、天然由来のHCVゲノム配列に人為的な改変を加えたゲノムRNAを有するウイルスも包含する。遺伝子型2aのHCVの具体例としては、JFH-1株 (特開 2002-171978号公報を参照) が挙げられる。

【0037】

本明細書において「C型肝炎ウイルスのゲノムRNA」とは、C型肝炎ウイルスの一本鎖の(+)鎖センスRNAからなるゲノムの全長にわたる塩基配列を有するRNAを意味する。限定するものではないが、遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAとしては、配列番号12に示す塩基配列からなるRNAが好ましい。

【0038】

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAの一つの実施形態は、C型肝炎ウイルスのゲノムRNA上の、5'非翻訳領域、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域と、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子と、少なくとも1つのIRES配列と、を含む塩基配列からなる、レプリコンRNAである。

【0039】

限定するものではないが、好ましくは、本発明の全長HCVレプリコンRNAは、5'非翻訳領域、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子、少なくとも1つのIRES配列、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域を、5'から3'方向へこの順番で含む。

【0040】

本明細書において、「5'非翻訳領域 (5'NTR又は5'UTR)」、「coreタンパク質コード配列 (core領域又はC領域)」、「E1タンパク質コード配列 (E1領域)」、「E2タンパク質コード配列 (E2領域)」、「NS2タンパク質コード配列 (NS2領域)」、「NS3タンパク質コード配列 (NS3領域)」、「NS4Aタンパク質コード配列 (NS4A領域)」、「NS4Bタンパク質コード配列 (NS4B領域)」、「NS5Aタンパク質コード配列 (NS5A領域)」、「NS5Bタンパク質コード配列 (NS5B領域)」、及び「3'非翻訳領域 (3'NTR又は3'UTR)」、並びにその他の特定の領域若しくは部位は、遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスであるJFH-1株 (特開 2002-171978号公報) のゲノムの全領域からなる全長ゲノムRNA (配列番号12) を基準として定めることができる。

【0041】

あるいは、本願発明におけるC型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム中の部分領域又はその部位は、JFH-1株のゲノムRNA (配列番号12) の部分塩基配列である配列番号1~11に示す配列を基準として定めることもできる。JFH-1株の全長ゲノムRNA (JFH-1クローン由来) (配列番号12) の「5'非翻訳領域」は、配列番号1に示す塩基配列からなる。また、「coreタンパク質コード配列」は配列番号2に示す塩基配列からなる。「E1タンパク質コード配列」は、配列番号3に示す塩基配列からなる。「E2タンパク質コード配列」は、配列番号4に示す塩基配列からなる。「NS2タンパク質コード配列」は、配列番号5に示す塩基配列からなる。「NS3タンパク質コード配列」は、配列番号6に示す塩基配列からなる。「NS4Aタンパク質コード配列」は、配列番号7に示す塩基配列からなる。「NS4Bタンパク質コード配列」は、配列番号8に示す塩基配列からなる。「NS5Aタンパク質コード配列」は、配列番号9に示す塩基配列からなる。「NS5Bタンパク質コード配列」は、配列番号10に示す塩基配列からなる。「3'非翻訳領域」は、配列番号11に示す塩基配列からなる。

列」は、配列番号 9 に示す塩基配列からなる。「NS5Bタンパク質コード配列」は、配列番号 10 に示す塩基配列からなる。「3'非翻訳領域」は、配列番号 11 に示す塩基配列からなる。

【0042】

例えば、HCV由来のRNA配列中の領域又は部位は、そのRNA配列を配列番号 1～12 に示す塩基配列に対してアラインメントし、配列番号 1～12 の配列中の塩基番号を基準として定めてもよい。このようなアラインメントにおいては、配列間でギャップ、付加、欠失、置換等が存在していてもよい。

【0043】

本発明のさらなる好適な実施形態では、本発明の全長HCVレプリコンRNAに含まれる5'非翻訳領域、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域が、それぞれ配列番号 1～11 に示す塩基配列を有することが好ましい。

【0044】

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAの好適な実施形態は、配列番号 1～11 に示す塩基配列と、少なくとも 1 つの選択マーカー遺伝子及び／又はリポーター遺伝子と、少なくとも 1 つのIRES配列と、からなるレプリコンRNAである。

【0045】

本発明において「選択マーカー遺伝子」とは、その遺伝子が発現された細胞だけが選択されるような選択性を細胞に付与することができる遺伝子を意味する。選択マーカー遺伝子の一般的な例としては抗生物質耐性遺伝子が挙げられる。本発明において好適な選択マーカー遺伝子の例としては、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ピリチアミン耐性遺伝子、アデニリルトランスフェラーゼ遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子などが挙げられるが、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子が好ましく、ネオマイシン耐性遺伝子がさらに好ましい。但し本発明における選択マーカー遺伝子はこれらに限定されるものではない。

【0046】

また本発明において「リポーター遺伝子」とは、その遺伝子発現の指標となる遺伝子産物をコードするマーカー遺伝子を意味する。リポーター遺伝子の一般的な例としては、発光反応や呈色反応を触媒する酵素の構造遺伝子が挙げられる。本発明において好適なリポーター遺伝子の例としては、トランスポゾンTn9由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、大腸菌由来の β グルクロニダーゼ若しくは β ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、緑色蛍光タンパク質遺伝子、クラゲ由来のエクオリン遺伝子、分泌型胎盤アルカリフォスファターゼ (SEAP) 遺伝子等が挙げられる。但し本発明におけるリポーター遺伝子はこれらに限定されるものではない。

【0047】

上記の選択マーカー遺伝子やリポーター遺伝子は、全長HCVレプリコンRNA中にどちらか一方のみが含まれていてもよいし、両方が含まれていてもよい。選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子は、全長HCVレプリコンRNAに 1 つ含まれていてもよいし、2 つ以上含まれていてもよい。

【0048】

本発明における「IRES配列」とは、RNAの内部にリボソームを結合させて翻訳を開始させることが可能な内部リボソーム結合部位を意味する。本発明におけるIRES配列の好適な例としては、以下に限定するものではないがEMCV IRES (脳心筋炎ウイルスの内部リボソーム結合部位)、FMDV IRES、HCV IRES、等が挙げられるが、EMCV IRES、及びHCV IRESがより好ましく、EMCV IRESが最も好ましい。

【0049】

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAのさらに好ましい 1 つの実施形態は、配列番号 13 に示す塩基配列からなるRNAである。さらに、この配列番号 13 に示す塩基配列において

、1～100個、好ましくは1～30個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～6個、最も好ましくは1～数個（2～5個）の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列からなるRNAであって、かつ、自律複製能及びウイルス粒子産生能を有するRNAも、好適な実施形態として本発明の全長HCVレプリコンRNAの範囲に含まれる。

【0050】

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAは、その全長HCVレプリコンRNAを導入する細胞内で発現させたい任意の外来遺伝子をコードするRNAをさらに含んでもよい。外来遺伝子をコードするRNAは、5'非翻訳領域の下流に連結してもよいし、選択マーカー遺伝子若しくはリポーター遺伝子の上流又は下流に連結させてもよいし、3'非翻訳領域の上流に連結してもよい。また、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、及びNS5Bタンパク質コード配列のいずれかの間に挿入してもよい。

【0051】

外来遺伝子をコードするRNAを含む全長HCVレプリコンRNAは、導入された細胞内で翻訳される際に、該外来遺伝子にコードされる遺伝子産物を発現することができる。従って外来遺伝子をコードするRNAを含む全長HCVレプリコンRNAは、外来遺伝子の遺伝子産物を細胞内で生成させることを目的とする場合にも、好適に使用することができる。

【0052】

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAは、リボザイムを含んでいてもよい。全長HCVレプリコンRNA中の選択マーカー遺伝子及び／又はリポーター遺伝子の下流にリボザイムを連結しておき、そのリボザイムの自己切断活性によって、選択マーカー遺伝子及び／又はリポーター遺伝子が、IRES配列、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域から切り離されるようにすることもできる。

【0053】

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAにおいては、上述したような選択マーカー遺伝子及び／若しくはリポーター遺伝子、ウイルスタンパク質をコードする配列、並びに外来遺伝子又はリボザイム等が、全長HCVレプリコンRNAから正しい読み枠で翻訳されるように連結される。全長HCVレプリコンRNAにコードされるタンパク質は、一続きのポリペプチドとして翻訳され発現された後でプロテアーゼによって各タンパク質へと切断され、遊離するように、プロテアーゼ切断部位等を介して互いに連結させることが好ましい。

【0054】

なお、本発明においてRNAが「自律複製能を有する」とは、RNAを細胞中に導入したときに、そのRNAが自己増殖することを意味する。限定するものではないが、RNAの自律複製能は、例えば、対象とするRNAをHuh7細胞中にトランスフェクションし、そのHuh7細胞を培養し、得られる培養物中の細胞から抽出したRNAについて、導入したRNAを特異的に検出可能なプローブを用いたノーザンブロットハイブリダイゼーションによりRNAを検出することによって、確認することができる。自律複製能を確認するための具体的な操作は、本明細書の実施例に記載されたコロニー形成能の測定、HCVタンパク質の発現確認、レプリコンRNAの検出等の記載に例示されている。

【0055】

さらに本発明において、RNAが「ウイルス粒子産生能を有する」とは、そのRNAを細胞（例えば、Huh7細胞などの培養細胞）に導入したときに、該細胞中でウイルス粒子が産生されることを意味する。ウイルス粒子産生能は、例えば、対象とするRNAを導入した細胞の培養上清について、そのRNAに特異的なプライマーを用いたRT-PCR法での検出を行う方法、又はその培養上清をシヨ糖濃度勾配法にかけてウイルス粒子を分離し、HCVタンパク質を検出する方法などにより、確認することができる。これらの具体的な操作は、本明細書の実施例に記載されたコロニー形成能の測定、HCVタンパク質の発現確認、レプリコンRNA

の検出等の記載に例示されている。

【0056】

2. 全長HCVレプリコンRNAの作製

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAは、当業者に公知である任意の遺伝子工学的手法を用いて作製することができる。限定するものではないが、全長HCVレプリコンRNAは、例えば遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスとしてJFH-1株を用いる場合には以下のような方法で作製することができる。

【0057】

まず、JFH-1株のゲノム全領域のRNA（配列番号12）に対応するDNA（この配列は、国際DNAデータバンクにアクセッション番号AB047639として登録されている）を、常法により再構築してRNAプロモーターの下流に挿入して、DNAクローンを作製する。ここで、「RNAに対応するDNA」とは、当該RNAの塩基配列のU（ウラシル）をT（チミン）に置き換えた塩基配列からなるDNAを意味する。前記RNAプロモーターは、プラスミドクローン中に含まれるものであることが好ましい。好適なRNAプロモーターとしては、限定するものではないが、T7 RNAプロモーター、SP6 RNAプロモーター、SP3 RNAプロモーターが挙げられるが、T7 RNAプロモーターが特に好ましい。

【0058】

次に、選択マーカー遺伝子及び／又はレポーター遺伝子、並びにIRES配列をコードするDNAを上記DNAクローンに挿入する。5'非翻訳領域の下流に、選択マーカー遺伝子及び／又はレポーター遺伝子を、さらにその下流にIRES配列を、挿入することが好ましい。

【0059】

次いで、以上のようにして作製されたDNAクローンを鋳型として、RNAポリメラーゼによりRNAを合成する。RNA合成は、5'非翻訳領域から、常法により開始させることができる。DNAクローンがプラスミドクローンの場合には、プラスミドクローンから制限酵素によって切り出したDNA断片を鋳型として用いてRNAを合成することもできる。なお、合成されるRNAの3'末端がウイルスゲノムRNAの3'非翻訳領域の末端と一致しており、他の配列が付加されたり削除されたりしないことが好ましい。このようにして合成されるRNAが、本発明に係る全長HCVレプリコンRNAである。

【0060】

3. HCV粒子の作製

上記のようにして作製される全長HCVレプリコンRNAを細胞に導入することにより、全長HCVレプリコンRNAを複製することができ、好ましくは持続的に複製することができる（すなわち、レプリコンRNAの複製能を有する）組換え細胞を得ることができる。本明細書では、全長HCVレプリコンRNAを複製している組換え細胞を「全長HCVレプリコンRNA複製細胞」と称する。

【0061】

この全長HCVレプリコンRNA複製細胞は、ウイルス粒子を産生することができる。産生されたウイルス粒子は、HCVのウイルスタンパク質から構成されるウイルス殻中に全長HCVレプリコンRNAを含有する。従って本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞から産生されるウイルス粒子は、HCV粒子である。すなわち本発明では、全長HCVレプリコンRNA複製細胞を培養することにより、HCV粒子を細胞培養系にて作製することができる。好ましくは、全長HCVレプリコンRNA複製細胞を培養し、その培養物（好ましくは培養上清）中に産生されたウイルス粒子を採取することにより、HCV粒子を取得することができる。

【0062】

あるいは、HCV粒子は、全長HCVゲノムRNAを導入して得られる組換え細胞によっても産生される。本発明に係る全長HCVゲノムRNA（好ましくはJFH-1クローン由来の全長HCVゲノムRNA、より好ましくは配列番号12に示す塩基配列を有するRNA）を導入した細胞では、その全長HCVゲノムRNAが高効率で複製される。本明細書では、全長HCVゲノムRNAを複製している組換え細胞を「全長HCVゲノムRNA複製細胞」と称する。この全長HCVゲノムRNA複製細胞によって産生されるウイルス粒子は、HCVのウイルスタンパク質から構成されるウイ

ルス殻中に全長HCVゲノムRNAを含有する。すなわち、本発明の全長HCVゲノムRNAを導入した細胞から産生されるウイルス粒子は、HCV粒子である。限定するものではないが、好ましくは、JFH-1クローン由来の全長HCVゲノムRNA（例えば、配列番号12に示す塩基配列を有するRNA）を導入した細胞を培養することによって、HCV粒子を細胞培養系にて作製することができる。例えば、全長HCVゲノムRNA（例えば、配列番号12に示す塩基配列を有するRNA）を導入した細胞を培養し、その培養物（好ましくは、培養上清）中に産生されたHCV粒子を採取することにより、HCV粒子を取得することができる。

【0063】

上記の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを導入する細胞としては、継代培養することが可能な細胞であれば任意の細胞を用いることができるが、真核細胞であることが好ましく、ヒト細胞であることがより好ましく、ヒト肝由来細胞、ヒト子宮頸由来細胞、又はヒト胎児腎由来細胞であることがさらに好ましい。これらの細胞としては、癌細胞株や幹細胞株などを含む増殖性細胞が好ましく、Huh7細胞、HepG2細胞、IMY-N9細胞、HeLa細胞、又は293細胞等がさらに好ましい。これらの細胞は、市販のものを利用してよいし、細胞寄託機関から入手して使用してもよいし、任意の細胞（例えば癌細胞又は幹細胞）から株化した細胞を使用してもよい。

【0064】

全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAの細胞内への導入は、当業者には公知の任意の技術を使用して行うことができる。そのような導入法としては、例えば、エレクトロポレーション、パーティクルガン法、リポフェクション法、リン酸カルシウム法、マイクロインジェクション法、DEAEセファロース法等が挙げられるが、エレクトロポレーションによる方法が特に好ましい。

【0065】

全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAは、単独で導入してもよいし、他の核酸と混合させたものを導入してもよい。導入するRNA量を一定にしながら全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAの導入量を変更したい場合には、所望の導入量の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを、導入する細胞から抽出したトータル細胞性RNAと混合して一定のRNA総量とし、それを細胞内導入に用いればよい。細胞内導入に用いるレプリコンRNAの量は、使用する導入法に応じて決めればよいが、好ましくは1ピコグラム～100マイクログラム、より好ましくは10ピコグラム～10マイクログラムの量を使用する。

【0066】

全長HCVレプリコンRNA複製細胞は、全長HCVレプリコンRNAに含まれる選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子の発現を利用して、選択することができる。具体的には、例えば、そのような全長HCVレプリコンRNAの細胞内導入処理を施した細胞を、選択マーカー遺伝子の発現により選択可能となる培地において培養すればよい。あるいは、そのような全長HCVレプリコンRNAの細胞内導入処理を施した細胞を培養した後、リポーター遺伝子（例えば、蛍光タンパク質）の発現について検出すればよい。

【0067】

一例として、全長HCVレプリコンRNAにネオマイシン耐性遺伝子が選択マーカー遺伝子として含まれる場合には、その全長HCVレプリコンRNAを用いてエレクトロポレーション処理した細胞を培養ディッシュに播種し、12～72時間、好ましくは16～48時間培養した後、培養ディッシュにG418（ネオマイシン）を0.05ミリグラム/ミリリットル～3.0ミリグラム/ミリリットルの濃度で添加し、その後、週に2回培養液を交換しながら培養を継続し、播種時から好ましくは10日間～40日間、より好ましくは14日間～28日間培養した後、クリスタルバイオレットで生存細胞を染色することにより、導入された全長HCVレプリコンRNAが複製されている細胞を、コロニーとして選択することができる。

【0068】

形成されたコロニーからは、常法により細胞をクローン化することができる。こうして得られる全長HCVレプリコンRNAを複製している細胞クローンを、本明細書では「全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローン」と称する。本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞は

、全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローンを包含する。

【0069】

全長HCVレプリコンRNA複製細胞については、複製された全長HCVレプリコンRNAを検出し、全長HCVレプリコンRNA中の選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子が細胞の宿主ゲノムDNAに組み込まれていないことを確認し、さらにHCVタンパク質の検出を行うことにより、実際に該細胞又は細胞クローンが全長HCVレプリコンRNAを複製していることを確認することができる。

【0070】

複製された全長HCVレプリコンRNAの検出は、当業者には公知の任意のRNA検出法に従って行えばよいが、例えば、細胞から抽出したトータルRNAについて、導入された全長HCVレプリコンRNAに対して特異的なDNA断片をプローブとして用いるノーザンハイブリダイゼーション法を実施することにより検出することができる。

【0071】

また全長HCVレプリコンRNA中の選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子が細胞の宿主ゲノムDNAに組み込まれていないことの確認は、限定するものではないが、例えば、細胞から抽出したゲノムDNAについて該選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子の少なくとも一部を増幅するPCRを行い、その増幅産物の有無を確認することによって行うことができる。増幅産物が確認された細胞では、宿主ゲノム中に選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子が組み込まれていると判断されることから、全長HCVレプリコンRNA自体は複製されていない可能性がある。この場合、全長HCVレプリコンRNAが複製されているか否かを、次に説明するHCVタンパク質の検出によって、さらに確認することができる。

【0072】

HCVタンパク質の検出は、例えば、導入された全長HCVレプリコンRNAから発現されるべきHCVタンパク質に対する抗体を、細胞から抽出したタンパク質と反応させることによって行うことができる。この方法は、当業者には公知の任意のタンパク質検出法によって行うことができるが、具体的には、例えば、細胞から抽出したタンパク質試料をニトロセルロース膜にブロッティングし、それに対して抗HCVタンパク質抗体（例えば、抗NS3特異的抗体、又はC型肝炎患者から採取した抗血清）を反応させ、さらにその抗HCVタンパク質抗体を検出することによって行うことができる。細胞から抽出したタンパク質中からHCVタンパク質が検出されれば、その細胞は、全長HCVレプリコンRNAを複製し、HCVタンパク質を発現しているものと判断することができる。

【0073】

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞のウイルス粒子産生能は、当業者には公知の任意のウイルス検出法に従って確認すればよい。例えば、ウイルス粒子を産生していると思われる細胞の培養上清をショ糖密度勾配により分画し、各分画の密度、HCVコアタンパク質濃度、及び全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNAの量を測定した結果、HCVコアタンパク質と全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNAのピークが一致し、しかもそのピークが検出される画分の密度が、培養上清を25% NP40（ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル[Polyoxyethylene(9)Octylphenyl Ether])で処理してから分画した場合の同画分の密度と比較して軽い（例えば、1.18~1.20 mg）場合には、該細胞はウイルス粒子産生能を有すると判定することができる。

【0074】

培養上清中に放出されたHCVウイルス粒子は、例えば、coreタンパク質、E1タンパク質、又はE2タンパク質に対する抗体を用いて検出することもできる。また、培養上清中の全長HCVレプリコンRNAを、特異的プライマーを用いたRT-PCR法により増幅して検出することによって、HCVウイルス粒子の存在を間接的に検出することもできる。

【0075】

4. 本発明のHCV粒子の他の細胞への感染

本発明のHCVウイルス粒子は、細胞（好ましくはHCV感受性細胞）への感染能を有する。本発明は、全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞を培養し、得ら

れた培養物（好ましくは、培養上清）中のウイルス粒子を他の細胞（好ましくはHCV感受性細胞）に感染させることを含む、C型肝炎ウイルス感染細胞を製造する方法にも関する。本発明において、HCV感受性細胞とは、HCVに対し感染性を有する細胞であり、好ましくは肝臓細胞またはリンパ球系細胞であるが、これらに限定されるものではない。具体的には、肝臓細胞としては初代肝臓細胞や、Huh7細胞、HepG2細胞、IMY-N9細胞、HeLa細胞、203細胞などが挙げられ、リンパ球系細胞としてはMolt4細胞や、HPB-Ma細胞、Daudi細胞などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0076】

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞において産生されたHCV粒子を細胞（例えば、HCV感受性細胞）に感染させると、その感染細胞中では全長HCVレプリコンRNAが複製され、さらにウイルス粒子が形成される。全長HCVレプリコンRNA複製細胞において産生されたウイルス粒子に感染した細胞は、選択マーカー遺伝子及び／又はリポーター遺伝子を発現するので、その発現を利用して選択及び／又は検出することが可能である。本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞において産生されたウイルス粒子を細胞に感染させることにより、全長HCVレプリコンRNAが細胞内で複製され、ウイルス粒子をさらに製造することができる。

【0077】

さらに、本発明の全長HCVゲノムRNA複製細胞において産生されたHCV粒子を細胞（例えば、HCV感受性細胞）に感染させることにより、その感染細胞中で全長HCVゲノムRNAが複製され、ウイルス粒子が形成される。本発明の全長HCVゲノムRNA複製細胞において産生されたウイルス粒子を細胞に感染させることにより、全長HCVゲノムRNAが細胞内で複製され、ウイルス粒子をさらに製造することができる。

【0078】

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞において産生されたHCVウイルス粒子は、チンパンジーなどのHCVウイルスに感染しうる動物に感染して、HCV由来の肝炎を引き起こすことができる。

【0079】

5. 本発明の他の実施形態

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞では、全長HCVレプリコンRNAが高効率で複製される。また本発明の全長HCVゲノムRNA複製細胞でも、全長HCVゲノムRNAが高効率で複製される。従って、本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞を用いて、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを高効率で製造することができる。

【0080】

本発明では、全長HCVレプリコンRNA複製細胞を培養し、培養物（培養細胞及び／又は培養培地）からRNAを抽出し、それを電気泳動法にかけ、分離された全長HCVレプリコンRNAを単離精製することによって、全長HCVレプリコンRNAを製造することができる。全長HCVゲノムRNA複製細胞を用いた場合にも、同様の方法で全長HCVゲノムRNAを製造することができる。このようにして製造されるRNAは、C型肝炎ウイルスの全長ゲノム配列を含む。この場合、C型肝炎ウイルスの全長ゲノム配列は、選択マーカー遺伝子及び／又はリポーター遺伝子並びにIRES配列によって分断されていてもよい。C型肝炎ウイルスの全長ゲノム配列を含むRNAの製造方法が提供されることにより、C型肝炎ウイルスゲノムに関してより詳細な分析が可能となる。

【0081】

さらに本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞は、HCVタンパク質を製造するために好適に使用することができる。HCVタンパク質の製造は、当業者に周知の任意の方法によって行えばよいが、例えば、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを細胞に導入して組換え細胞を作製し、該組換え細胞を培養し、得られる培養物（培養細胞及び／又は培養培地）から常法によりタンパク質を回収することによって行えばよい。

【0082】

また本発明のHCVウイルス粒子は、肝細胞指向性を有しうる。そのため本発明の全長HCVレプリコンRNAを使用して、肝細胞指向性ウイルスベクターを製造することができる。このウイルスベクターは、遺伝子治療用に好適に用いられる。本発明では、外来遺伝子をコードするRNAを全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAに組み込み、そのRNAを細胞に導入することにより、該外来遺伝子を細胞中に導入し、細胞内で複製させ、さらに発現させることができる。さらに、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNA中のE1タンパク質コード配列、及び／又はE2タンパク質コード配列を、他の生物種由来のウイルスの外殻タンパク質に変換したRNAを作製することにより、そのRNAを様々な生物種の細胞に感染させることも可能となる。この場合にも、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAにさらに外来遺伝子を組み込んで、それを、該外来遺伝子を肝細胞で発現させるための肝細胞指向性ウイルスベクターとして使用することができる。

【0083】

本発明は、配列番号12に示す塩基配列からなるRNAに外来遺伝子をコードするRNAを挿入し、それを細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、外来遺伝子を含有するウイルスベクターを製造する方法にも関する。

【0084】

本発明は、本発明に係るHCV粒子又はその一部分を抗原として用いて、C型肝炎ワクチンを製造する方法も提供する。

【0085】

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞、又はそれらの細胞において産生されるウイルス粒子を感染させたC型肝炎ウイルス感染細胞は、例えばC型肝炎ウイルスの複製、ウイルス粒子の再構築、ウイルス粒子の放出を促進又は抑制する物質（抗C型肝炎ウイルス物質）をスクリーニングするための試験系として使用することもできる。具体的には、例えば、被験物質の存在下でそれらの細胞を培養し、得られる培養物中の全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNA又はウイルス粒子を検出し、その被験物質がレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNAの複製又はウイルス粒子の形成若しくは放出を促進又は抑制するかどうかを判定することにより、C型肝炎ウイルスの増殖を促進又は抑制する物質をスクリーニングすることができる。この場合、培養物中の全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNAの検出は、上記細胞から抽出したRNA中の全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNAの量、割合若しくは有無を測定することによるものであってよい。培養物（主として培養上清）中のウイルス粒子の検出は、培養上清中に含まれるHCVタンパク質の量、割合若しくは有無を検出するものであってよい。

【0086】

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞において産生されたHCV粒子とHCV感受性細胞とを、HCVの細胞への結合を促進又は抑制する物質をスクリーニングするための試験系として使用することもできる。具体的には例えば、被験物質の存在下で、本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞において産生されたHCV粒子とともにHCV感受性細胞を培養し、得られる培養物中の全長HCVレプリコンRNA又はウイルス粒子を検出し、その被験物質がレプリコンRNAの複製又はウイルス粒子の形成を促進又は抑制するかどうかを判定することにより、C型肝炎ウイルスの増殖を促進又は抑制する物質をスクリーニングすることができる。

【0087】

このような全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNA又はウイルス粒子の検出は、上述の手法又は後述の実施例に従って行うことができる。上記試験系は、C型肝炎ウイルス感染の予防剤、治療剤若しくは診断剤の製造又は評価のためにも使用することができる。

【0088】

具体的には、本発明の上記試験系の利用例としては以下が挙げられる。

(1) HCVの増殖及び感染を抑制する物質の探索

HCVの増殖及び感染を抑制する物質としては、例えば、直接的若しくは間接的にHCVの増

殖及び感染に影響を及ぼす有機化合物、あるいはHCVゲノム若しくはその相補鎖の標的配列にハイブリダイズすることによりHCVの増殖若しくはHCVタンパク質の翻訳に直接的又は間接的に影響を及ぼすアンチセンスオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

(2) 細胞培養中で抗ウイルス作用を有する各種物質の評価

前記各種物質としては、合理的ドラッグデザイン又はハイスループットスクリーニングを用いて得られた物質（例えば単離精製された酵素）等が挙げられる。

(3) HCVに感染した患者の治療のための、新規攻撃標的の同定

例えばHCVウイルス増殖のために重要な役割を果たす宿主細胞性タンパク質を同定するために、本発明に係る全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞を使用することができる。

(4) HCVウイルスの薬剤等に対する耐性獲得能の評価及び該耐性に関わる変異の同定

(5) C型肝炎ウイルス感染の診断薬又は治療薬の開発、製造及び評価のために使用可能な抗原としてのウイルスタンパク質の製造

(6) C型肝炎ウイルス感染のワクチンの開発、製造及び評価のために使用可能な抗原としてのウイルスタンパク質及び弱毒化HCVの製造

【実施例】

【0089】

本発明を、以下の実施例及び図面に基づいてさらに具体的に説明する。但し、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【0090】

[実施例1] 全長HCVゲノムRNA由来の全長HCVレプリコンRNAの作製

(A) 発現ベクターの構築

劇症肝炎の患者から分離したC型肝炎ウイルスであるJFH-1株（遺伝子型2a）のゲノム全長cDNAを含むDNA（JFH-1クローン）を、pUC19プラスミド中でT7 RNAプロモーター配列の下流に挿入したプラスミドDNAを作製した。

【0091】

具体的には、JFH-1株のウイルスRNAを増幅したRT-PCR断片をpGEM-T EASY vector (Promega)にクローニングしてpGEM1-258、pGEM44-486、pGEM317-849、pGEM617-1323、pGEM1141-2367、pGEM2285-3509、pGEM3471-4665、pGEM4547-5970、pGEM5883-7003、pGEM6950-8035、pGEM7984-8892、pGEM8680-9283、pGEM9231-9634及びpGEM9594-9678の各プラスミドDNAを得た（非特許文献6を参照）。各プラスミドに含まれるウイルスゲノムRNA由来のcDNAをPCR法および制限酵素を用いてつなぎ合わせて、全長のウイルスゲノムcDNAをクローニングした。全長のウイルスゲノムの上流にT7 RNAプロモーター配列を挿入した。このようにして構築されたプラスミドDNAを、以下、pJFH1と称する（図1上段）。なお、上記JFH-1クローンの作製については、特許文献1及び非特許文献3に記載されている。またJFH-1クローンの全長cDNAの塩基配列は、国際DNAデータベース（DDBJ/EMBL/GenBank）のアクセッション番号：AB047639に登録されている。

【0092】

次に、プラスミドDNAであるpJFH1の5'非翻訳領域とcore領域の間に、EMCV-IRES（脳心筋炎ウイルスの内部リボゾーム結合部位）及びネオマイシン耐性遺伝子（neo；ネオマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子とも称する）を挿入して、プラスミドDNAであるpFGREP-JFH1を構築した（図1の下段）。この構築手順は、既報（非特許文献4）に従った。また、pJFH1及びpFGREP-JFH1中のNS5B領域について、該領域にコードされるRNAポリメラーゼの活性中心に相当するアミノ酸モチーフGDDをGNDに変異させる突然変異を導入して、突然変異プラスミドクローンpJFH1/GND、及びpFGREP-JFH1/GNDも作製した。突然変異クローンpJFH1/GND及びpFGREP-JFH1/GNDは、それにコードされるNS5Bタンパク質の活性部位のアミノ酸配列が変異しているため、レプリコンRNAを複製するのに必要な活性NS5Bタンパク質を発現することができない。

【0093】

(B) 全長HCVゲノムRNAと全長HCVレプリコンRNAの作製

全長HCVゲノムRNA合成及び全長HCVレプリコンRNA合成に用いる鋳型DNAを作製するため、上記のとおり構築した発現ベクターpJFH1、pJFH1/GND、pFGREP-JFH1、pFGREP-JFH1/GNDを、それぞれ制限酵素XbaIで切断した。次いで、これらのXbaI切断断片のそれぞれについて、10~20 μ gを50 μ lの反応液中に含有させ、Mung Bean Nuclease 20 Uを用いて30℃で30分間インキュベートすることにより、さらに処理した。Mung Bean Nucleaseは、二本鎖DNA中の一本鎖部分を選択的に分解する反応を触媒する酵素である。通常、上記XbaI切断断片をそのまま鋳型として用いてRNA合成を行うと、XbaIの認識配列の一部であるCUGAの4塩基が3'末端に余分に付加されたレプリコンRNAが合成されてしまう。そこで本実施例では、XbaI切断断片をMung Bean Nucleaseで処理することにより、XbaI切断断片からCUGAの4塩基を除去した。この後、XbaI切断断片を含むMung Bean Nuclease処理後の溶液について、通常法に従ったタンパク質除去処理により、CUGAの4塩基が除去されたXbaI切断断片を精製して、これを鋳型DNAとした。

【0094】

次に、この鋳型DNAから、T7 RNAポリメラーゼを用いてRNAをin vitro合成した。このRNA合成にはAmbion社のMEGAscriptを用いた。鋳型DNAを0.5~1.0マイクログラム含む反応液20 μ lを製造業者の使用説明書に従って反応させた。

【0095】

RNA合成終了後、反応溶液にDNase (2 U) を添加して37℃で15分間反応させた後、さらに酸性フェノールによるRNA抽出を行って、鋳型DNAを除去した。このようにしてpJFH1、pJFH1/GND、pFGREP-JFH1、pFGREP-JFH1/GNDに由来する上述の鋳型DNAから合成したRNAを、それぞれrJFH1、rJFH1/GND、rFGREP-JFH1、rFGREP-JFH1/GNDと命名した。これらのRNAの塩基配列を、rJFH1、rFGREP-JFH1については配列番号12及び13、rJFH1/GND、rFGREP-JFH1/GNDについては配列番号14及び15にそれぞれ示す。rJFH1は、JFH-1株の全長HCVゲノムと同じ配列構造をもつ、本発明の全長HCVゲノムRNAの一例である。rFGREP-JFH1は、本発明における全長HCVレプリコンRNAの一例である。

【0096】

[実施例2] 細胞内における全長HCVゲノムRNA複製細胞とウイルス粒子産生

(C) 細胞内における全長HCVゲノムRNAの複製とウイルス粒子の産生

上記の通り合成した全長HCVゲノムRNA (rJFH1、rJFH1/GND) のそれぞれを、様々な量で、Huh7細胞から抽出したトータル細胞性RNAと混合して、RNA総量が10 μ gとなるように調製した。次いでその混合RNAをエレクトロポレーション法によりHuh7細胞に導入した。エレクトロポレーション処理を行ったHuh7細胞を培養ディッシュに播種し、12時間、24時間、48時間及び72時間培養した後に、細胞を回収して、細胞からRNAを抽出して、ノーザンブロットで解析した。ノーザンブロット解析は、Molecular Cloning, A laboratory Manual, 2nd edition, J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)の記載に従って行った。具体的には、培養後の細胞から抽出したRNAを変性アガロース電気泳動に供し、泳動終了後にRNAをポジティブチャージナイロン膜に転写した。pJFH1から作製した³²PラベルしたDNAまたはRNAプローブを、前記のとおり膜に転写したRNAに対しハイブリダイゼーションさせ、次いでその膜を洗浄し、それをフィルムに感光させることにより、JFH-1クローンの全長HCVゲノムRNAに特異的なRNAバンドを検出した。

【0097】

図2に示すように、rJFH1/GNDをトランスフェクションした場合、トランスフェクション4時間後において、導入したRNAバンドは弱いシグナルとして確認できたが、時間の経過とともにシグナルは減弱し、24時間後にはほとんどバンドのシグナルが確認できなかった。一方、rJFH1をトランスフェクションした場合、トランスフェクションの4時間後~12時間後には、導入したRNAバンドのシグナルの強さはrJFH1/GNDを導入した場合と同様にいったん減弱したが、24時間以降にははっきりとしたRNAバンドのシグナルが確認できた。確認されたシグナルはHCVゲノムRNAに特異的であった。つまり導入した全長HCVゲノムRNAの一部が複製増殖したものと考えられた。RNA複製酵素であるNS5Bの活性モチー

フを変異させたrJFH1/GNDでは複製はみられず、NS5Bの活性が全長HCVゲノムRNAの複製に重要であることが示された。一方、これまでに分離されたH77株（非特許文献7）、J6株（非特許文献8）や本発明者らが慢性肝炎から分離したJCH1株（非特許文献6）などのC型肝炎ウイルス株に由来する全長HCVゲノムRNAについても同様の実験をおこなったが、これらの株では全長HCVゲノムRNAの複製は全く確認できなかった。

【0098】

(D) トランスフェクション細胞培養液中のHCVウイルス粒子の検出

上記に従ってエレクトロポレーション処理を行ったHuh7細胞を培養ディッシュに播種し、12時間、24時間、48時間、及び72時間培養した後、培養上清中のHCVコアタンパク質を測定した。測定はオーソHCV抗原IRMAテストによって行った（非特許文献9）。図3に示す通り、rJFH1をトランスフェクションして48時間後及び72時間後の培養上清中にコアタンパク質が検出された。このコアタンパク質がウイルス粒子として分泌されているかどうかを確認するため、rJFH1をトランスフェクションした72時間後の培養液をショ糖密度勾配により分画した。60%（重量/重量）ショ糖溶液（50mM Tris pH7.5/0.1M NaCl/1mM EDTAに溶解）2ml、50%ショ糖溶液1ml、40%ショ糖溶液1ml、30%ショ糖溶液1ml、20%ショ糖溶液1ml、10%ショ糖溶液1mlを遠心チューブに重層し、さらにその上にサンプルの培養上清を4ml重層した。これをベックマンローターS W41Tiで400,000RPM、4℃、16時間遠心した。遠心終了後遠心チューブの底から0.5mlずつ分画回収した。各分画の密度、HCVコア蛋白濃度、全長HCVゲノムRNA量を定量した。全長HCVゲノムRNAの定量的RT-PCRによる検出は、Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, Abe A, Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Kawaguchi R, Tanaka S, Kohara M. Real-Time detection system for quantification of Hepatitis C virus genome. Gastroenterology 116: 636-642 (1999)に従い、全長HCVゲノムRNAの5'非翻訳領域のRNAを検出することによって行った。具体的には、細胞から抽出したRNAに含まれる全長HCVゲノムRNAを、合成プライマー、R6-130-S17: 5' -CGGGAGAGCCATAGTGG-3'（配列番号16）、R6-290-R19: 5' -AGTACCACAAGGCCTTTCG-3'（配列番号17）、TaqMan Probe: R6-148-S21FT, 5' -CTGCGGAACCGGTGAGTACAC-3'（配列番号18）とEZ rTth RNA PCR kitを用いてPCR増幅し、次いでABI Prism 7700 sequence detector systemにより検出した。

【0099】

図4に示すように11番のフラクションでコアタンパク質と全長HCVゲノムRNAのピークが一致した。このフラクションの密度は約1.18mg/mlであり、これまで報告されているコアタンパク質と核酸の結合物よりも軽い比重であった。さらに培養上清を0.25% NP40で処理した後に同様の分画を行うと、コアタンパク質と全長HCVゲノムRNAのピークは比重約1.28mg/mlへとシフトした。つまり、NP40処理により、脂質を含む比重の軽い表面膜がウイルス粒子から剥離して、核酸とコアタンパク質のみのコア粒子となった結果、比重が重くなったと考えられた。以上の結果から、rJFH1をHuh7細胞へトランスフェクションすることにより細胞内で全長HCVゲノムRNAが複製されたこと、さらにウイルス粒子が形成され、培養上清中に分泌されたことが明らかになった。

【0100】

[実施例3]

(E) 全長HCVレプリコンRNA複製細胞の作製及び細胞クローンの樹立

実施例1で作製したrFGREP-JFH1及びrFGREP-JFH1/GNDを、実施例2と同様にしてHuh7細胞へトランスフェクションして全長HCVレプリコンRNA複製細胞の作製を行い、さらに全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローンの樹立を試みた。

【0101】

まず、rFGREP-JFH1及びrFGREP-JFH1/GNDのそれぞれをHuh7細胞へトランスフェクションした後、培養ディッシュにその細胞を播種した。16時間から24時間培養した後にG418を様々な濃度で添加した。週に2回培養液を交換しながら培養を継続した。21日間培養した後、クリスタルバイオレットで生存細胞を染色した。染色されるコロニー数を計測し、トランスフェクションしたRNA重量あたりに得られたコロニー数を計算した。また、一

部の培養ディッシュでは生存細胞のコロニーをクローン化して培養を継続した。クローン化された細胞からRNA、ゲノムDNA、タンパク質をそれぞれ抽出した後、全長HCVレプリコンRNAの検出、ネオマイシン耐性遺伝子のゲノムDNAへの組み込みの有無、HCVタンパク質の発現を検討した。これらの結果の詳細は下記に示す。

【0102】

(F) コロニー形成能

上記のトランスフェクションの結果、トランスフェクションしたレプリコンRNA 1 μ g 当たりのコロニー形成能は、rFGREP-JFH1をトランスフェクションしたHuh7細胞では、G418濃度が1.0 mg/mlの場合、368 CFU (Colony Forming Unit; コロニー形成単位)/ μ g \cdot RNAであった(図5の左側)。これに対して、rFGREP-JFH1/GNDをトランスフェクションしたHuh7細胞では、コロニー形成が認められなかった(図5の右側)。このことは、rFGREP-JFH1レプリコンRNAをトランスフェクションしたHuh7細胞のコロニー形成能は、rFGREP-JFH1から発現されるNS5B (RNAポリメラーゼ) の活性に依存することを示した。つまり、コロニーを形成した細胞では、rFGREP-JFH1から発現されるNS5BのはたらきによりrFGREP-JFH1レプリコンRNAが自律複製することによって、ネオマイシン耐性遺伝子が持続的に発現されG418耐性が維持される結果、細胞増殖が可能になったものと考えられた。

【0103】

(G) 樹立した細胞クローンにおける全長HCVレプリコンRNAの検出

上記(E)に従ってrFGREP-JFH1のHuh7細胞へのトランスフェクションにより樹立した全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローンから、酸性フェノール抽出法によりトータルRNAを抽出した。次いでこのトータルRNAをノーザンブロット法により解析した。プローブとしてはpFGREP-JFH1特異的プローブを用いた。対照としては、トランスフェクションを行っていないHuh7細胞から同様に抽出したトータルRNA(図6中、「Huh7」として示す)、Huh7細胞から抽出したトータルRNAに試験管内で合成したレプリコンRNAを10の7乗コピー加えたサンプル(図6中、「 10^7 」として示す)、及びHuh7細胞から抽出したトータルRNAに試験管内で合成したレプリコンRNAを10の8乗コピー加えたサンプル(図6中、「 10^8 」として示す)を用いた。図6中、1~4は細胞クローンの番号である。

【0104】

この結果、rFGREP-JFH1と同程度の大きさのRNAがpFGREP-JFH1特異的プローブにより検出された(図6)。これにより、トランスフェクションしたrFGREP-JFH1レプリコンRNAが細胞クローン内で複製増殖していることが確認された。また細胞クローン間で、レプリコンRNAの量に差があることが示された。図6中、例えば、クローン2はレプリコンRNAの量が他のクローンに比べて少なかった。

【0105】

(H) ネオマイシン耐性遺伝子のゲノムDNAへの組み込みの有無の確認

(E)に従って得られた細胞クローン1~8(図7中ではFGR-JFH1/2-1~FGR-JFH1/2-8と表記)について、その細胞クローンのG418に対する耐性がネオマイシン耐性遺伝子の宿主細胞ゲノムへの組み込みによるものでないことを確認するために、ネオマイシン耐性遺伝子特異的プライマー(センスプライマー、NEO-S3: 5'-AACAAGATGGATTGCACGCA-3'(配列番号19)、アンチセンスプライマー、NEO-R: 5'-CGTCAAGAAGGCGATAGAAG-3'(配列番号20))を用いて、細胞クローンから抽出した宿主細胞のゲノムDNAを鋳型とするPCR増幅を行った。この結果、図7に示すとおり、ネオマイシン耐性遺伝子の増幅が示された陽性クローンは認められなかった。

【0106】

この(H)の結果から、本発明の全長HCVレプリコンRNAをトランスフェクションし樹立した細胞クローンでは、全長HCVレプリコンRNAが複製されていることが確認された。

【0107】

(I) HCVタンパク質の検出

rFGREP-JFH1をトランスフェクションし樹立した細胞クローンから常法によりタンパク質を抽出して、SDS-PAGE及びウエスタンブロット法による解析を行った。調べた細胞クロー

ーンは、上記 (G) で用いたものと同じである。合成した全長HCVゲノムRNAをHuh7細胞に一過性にトランスフェクションして得られた細胞抽出液を陽性対照とした (図8、図9及び図10中、JFH-1として示す)。HCVのサブジェノミックRNAレプリコン (SGR-JFH1) をトランスフェクションして得られたクローン細胞抽出液をcoreタンパク質の陰性対照として、及びNS3、NS5aタンパク質の陽性対照として用いた (図8、図9及び図10中、SGR-JFH1として示す)。トランスフェクションしていないHuh7細胞抽出液は全ての陰性対照として用いた (図8、図9及び図10中、Huh7として示す)。それぞれの細胞クローンから抽出したタンパク質試料をPVDF膜 (Immobilon-P, Millipore社製) にブロッティングし、抗core特異的抗体及び抗NS3特異的抗体 (Dr. Moradpour より分与されたもの; Wolk B, et al, J. Virology. 2000; 74: 2293-2304) を用いて、全長HCVレプリコンRNAにコードされているcoreタンパク質及びNS3タンパク質を検出した。図8及び図9に示される通り、rFGREP-JFH1をトランスフェクションし樹立した細胞クローン1~4では、それぞれのタンパク質について陽性対照と同じ大きさのタンパク質が検出された。トランスフェクションしていないHuh7細胞ではcoreタンパク質、及びNS3タンパク質も検出されなかったため、細胞クローン1~4では、トランスフェクションされた全長HCVレプリコンRNAが自律複製し、さらにcoreタンパク質やNS3タンパク質が発現されていることが確認された。

【0108】

なお、C型肝炎患者の血清を抗体として用いることにより、上記でNS3タンパク質の発現が確認された各細胞クローンについて、全長HCVレプリコンRNAからのNS5Aタンパク質の発現も同様に確認した (図10)。

【0109】

以上の(H)及び(I)の結果から、全長HCVレプリコンRNAをトランスフェクションし樹立した細胞クローンでは、全長HCVレプリコンRNAが複製され、さらにウイルスタンパク質が発現されていることが確認された。

【0110】

(J) 全長HCVレプリコンRNA複製細胞におけるウイルス粒子産生

上記(E)に従ってrFGREP-JFH1をHuh7細胞へトランスフェクションし、樹立した全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローン2及び3 (FGR-JFH1/2-3) の培養上清を回収して、上記(D)と同様の方法で、培養上清中のHCVウイルス粒子を測定した。この結果を図11に示す。図11中、網掛けの円は各フラクション (画分) の比重 (g/ml) を示す。また黒塗りの円は、coreタンパク質の量 (fmol/L) を示す。白抜きの円は、全長HCVレプリコンRNAの力価 ($\times 0.1$ コピー/mL) を示す。

【0111】

図11に示すように、比重が約1.18~1.20 mg/mlとなるフラクションで、coreタンパク質と全長HCVレプリコンRNAのピークは一致していた。またそれよりも軽い分画にも小さなピークを認めた。以上の結果から、rFGREP-JFH1をトランスフェクションしたHuh7細胞中では、全長HCVレプリコンRNAが複製されたこと、及びウイルス粒子が形成されて培養上清中に分泌されたことが示された。

【0112】

[実施例4]

(K) 培養上清中のウイルス粒子の感染実験

(H) で用いた細胞クローン1~8 (FGR-JFH1/2-1、FGR-JFH1/2-2、FGR-JFH1/2-3、FGR-JFH1/2-4、FGR-JFH1/2-5、FGR-JFH1/2-6、FGR-JFH1/2-7、FGR-JFH1/2-8) のそれぞれの培養上清をHuh7細胞に添加して、培養上清中のウイルス粒子をHuh7細胞に感染させた。感染翌日に感染させたHuh7細胞の培養液にG418を0.3mg/ml添加し、さらに21日間培養した。培養終了後に細胞を固定し、クリスタルバイオレットで染色したところ、FGR-JFH1/2-3、FGR-JFH1/2-5、FGR-JFH1/2-6の培養上清を用いて感染させた細胞についてコロニー形成が観察された。一方、対照に用いたサブジェノミックレプリコン細胞SGR-JFH1/4-1 (非特許文献6記載) の培養上清を用いて感染させた細胞ではコロニー形成はみられなかった。図12に、FGR-JFH1/2-3とSGR-JFH1/4-1の培養上清4mlまたは8mlをHuh7細胞に添加し、2

1日間培養した後に染色した培養ディッシュの写真を示す。FGR-JFH1/2-3の培養上清 4 ml を添加した細胞を播種したディッシュには3コロニー、FGR-JFH1/2-3の培養上清 8 ml を添加した細胞を播種したディッシュには9コロニーの形成を確認した。しかし、SGR-JFH1/4-1の培養上清を添加した細胞を播種したディッシュではコロニー形成はみられなかった。

【0113】

FGR-JFH1/2-3、FGR-JFH1/2-5の培養上清を用いてC型肝炎ウイルスに感染させ、形成されたコロニーを、次いでクローン化した。FGR-JFH1/2-3の培養上清を用いた培養ディッシュから、FGR-JFH1/C2-3-11、FGR-JFH1/C2-3-12、FGR-JFH1/C2-3-13の3クローンを樹立した。FGR-JFH1/C2-5の培養上清を用いた培養ディッシュから、FGR-JFH1/C2-5-11、FGR-JFH1/C2-5-12の2クローンを樹立した。

【0114】

FGR-JFH1/C2-3-11、FGR-JFH1/C2-3-12、FGR-JFH1/C2-3-13、FGR-JFH1/C2-5-11、FGR-JFH1/C2-5-12の各細胞クローンの培養上清を用いて再度Huh7細胞を感染させると、FGR-JFH1/C2-3-12、FGR-JFH1/C2-5-12の培養上清を用いた培養ディッシュではコロニーの形成が観察された。FGR-JFH1/C2-3-12の培養上清を用いて感染させた細胞から、さらにFGR-JFH1/C2-3-12-1、FGR-JFH1/C2-3-12-2の2クローンを樹立した。FGR-JFH1/C2-5-12の培養上清を用いて感染させた細胞から、さらにFGR-JFH1/C2-5-12-1、FGR-JFH1/C2-5-12-2の2クローンを樹立した。

【0115】

以上の通り全長HCVレプリコンRNA複製細胞の培養上清を用いて感染させ、その感染細胞より樹立したこれらの細胞クローンから、RNA、タンパク質、ゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAを鋳型としたPCRでネオマイシン耐性遺伝子の組み込みの有無を検討したところ、いずれも陰性であった。また、RNAを鋳型とする定量的PCR法により、細胞内で複製している全長HCVレプリコンRNAを検出することができた。さらに培養上清中にcoreタンパク質を検出することができた。この結果は、本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞から産生された全長HCVレプリコンRNAを含むウイルス粒子が、新たな細胞に感染することができることを示している。

【産業上の利用可能性】

【0116】

本発明の方法により、HCVウイルス粒子を細胞培養系で作製することができる。また本発明に係る全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを導入した細胞を用いれば、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを複製し、本発明のHCVウイルス粒子を細胞培養系で持続的に産生させることができる。本発明の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを導入した細胞は、HCVの複製過程、ウイルス粒子形成過程、ウイルス粒子の細胞外放出過程に影響を及ぼす各種物質をスクリーニングするための試験系として利用することもできる。本発明の全長HCVレプリコンRNA及び全長HCVゲノムRNA並びにウイルス粒子は、外来遺伝子のウイルスベクターとしても有用である。本発明のウイルス粒子又はその一部分はまた、C型肝炎ウイルスに対するワクチン抗原としてワクチンに含有させることができる。さらに、本発明のウイルス粒子と他の細胞とを一緒に培養する系を、ウイルス粒子の細胞への感染に影響を及ぼす各種物質をスクリーニングするための試験系として利用することができる。本発明の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAはまた、HCVの全長ゲノム配列を容易に複製することができる鋳型としても有用である。

【図面の簡単な説明】

【0117】

【図1】 図1は、本発明の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを作製するための鋳型DNAの構築手順を示す概略図である。図1の上段は、T7プロモーターの下流に全長HCVゲノムを挿入して作製したプラスミドクローンpJFH1の構造を示す。図1の下段は、pJFH1のT7プロモーターと5'非翻訳領域の下流にネオマイシン耐性遺伝子とEMCV IRESを含むDNA断片を挿入した、全長HCVゲノム配列を含むプラスミドクローンpFGREP-JFH1の構造を示す。図中の記号は以下のとおりである。T7: T7 RNAプロモ

ター、5'UTR: 5'非翻訳領域、C: コアタンパク質、E1、E2: エンベロープタンパク質。NS2、NS3、NS4A、NS4B、4A、4B: 非構造タンパク質。3'UTR: 3'非翻訳領域。Age I、Pme I、Xba I: 制限酵素Age I、Pme I及びXba Iの切断部位。GDD: NS5Bタンパク質の活性中心に相当するアミノ酸モチーフGDDの位置。neo: ネオマイシン耐性遺伝子、EMCV IRES: EMCV IRES (脳心筋炎ウイルスの内部リボソーム結合部位)。

【図2】図2は、全長HCVゲノムRNAであるrJFH-1を導入したHuh7細胞におけるrJFH-1の複製を示すノーザンブロット解析の結果を示す写真である。

【図3】図3は、培地中のHCVコアタンパク質の定量の結果を示す。白抜きの円はrJFH1を導入した細胞、黒塗りの円はrJFH1/GNDを導入した細胞を示す。

【図4】図4は、rJFH-1を導入したHuh7細胞の培養上清をシヨ糖密度勾配により分画した各画分についての、HCVコアタンパク質量及び全長HCVゲノムRNA量、並びに比重を示すグラフである。黒塗りの円はHCV コア(core)タンパク質、白抜きの円は全長HCVゲノムRNA、網掛けの円は比重を示す。

【図5】図5は、全長HCVレプリコンRNAであるrFGREP-JFH1をトランスフェクションしたHuh7細胞のコロニー形成を示す写真である。

【図6】図6は、rFGREP-JFH1のHuh7細胞へのトランスフェクションにより樹立した全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローンにおける、全長HCVレプリコンRNAの複製を示す写真である。

【図7】図7は、ゲノムDNA中へのネオマイシン耐性遺伝子の組み込みの有無を確認するための、宿主細胞のゲノムDNAを鋳型とし、ネオマイシン耐性遺伝子特異的プライマーを用いてPCR増幅した結果を示す写真である。M: DNAサイズマーカー、P: 陽性対照、N: Huh7細胞。

【図8】図8は、全長HCVレプリコンRNAであるrFGREP-JFH1を導入したHuh7細胞におけるcoreタンパク質の発現を示すウェスタンブロット解析の結果を示す写真である。

【図9】図9は、全長HCVレプリコンRNAであるrFGREP-JFH1を導入したHuh7細胞におけるNS3タンパク質の発現を示すウェスタンブロット解析の結果を示す写真である。

【図10】図10は、全長HCVレプリコンRNAであるrFGREP-JFH1を導入したHuh7細胞におけるNS5Aタンパク質の発現を示すウェスタンブロット解析の結果を示す写真である。

【図11】図11は、rFGREP-JFH1を導入したHuh7細胞の培養上清をシヨ糖密度勾配により分画した各画分についての、HCV coreタンパク質量及び全長HCVレプリコンRNA量、並びに比重を示すグラフである。黒塗りの円はHCV コア(core)タンパク質、白抜きの円は全長HCVレプリコンRNA、網掛けの円は比重を示す。

【図12】図12は、全長HCVレプリコンRNA複製細胞の培養上清に含まれるウイルス粒子を添加したHuh7細胞のコロニー形成を示す写真である。

【配列表フリーテキスト】

【0118】

配列番号1の配列は、JFH-1クローン由来のHCVゲノムRNAの5'非翻訳領域を示す。

配列番号2の配列は、JFH-1クローン由来のHCVゲノムRNAのcoreタンパク質コード配列を示す。

配列番号3の配列は、JFH-1クローン由来のHCVゲノムRNAのE1タンパク質コード配列を示す。

配列番号4の配列は、JFH-1クローン由来のHCVゲノムRNAのE2タンパク質コード配列を示す。

配列番号5の配列は、JFH-1クローン由来のHCVゲノムRNAのNS2タンパク質コード配列を示す。

配列番号6の配列は、JFH-1クローン由来のHCVゲノムRNAのNS3タンパク質コード配列を示す。

配列番号7の配列は、JFH-1クローン由来のHCVゲノムRNAのNS4Aタンパク質コード配列を示す。

示す。

配列番号 8 の配列は、JFH-1 クローン由来の HCV ゲノム RNA の NS4B タンパク質コード配列を示す。

配列番号 9 の配列は、JFH-1 クローン由来の HCV ゲノム RNA の NS5A タンパク質コード配列を示す。

配列番号 10 の配列は、JFH-1 クローン由来の HCV ゲノム RNA の NS5B タンパク質コード配列を示す。

配列番号 11 の配列は、JFH-1 クローン由来の HCV ゲノム RNA の 3' 非翻訳領域を示す。

配列番号 12 の配列は、JFH-1 クローン由来の全長 HCV ゲノム RNA を示す。

配列番号 13 の配列は、JFH-1 クローン由来の全長 HCV ゲノム RNA を含む レプリコン RNA を示す。

配列番号 14 の配列は、アミノ酸モチーフ GDD を GND に変異させた、JFH-1 クローン由来の全長 HCV ゲノム RNA を示す。

配列番号 15 の配列は、アミノ酸モチーフ GDD を GND に変異させた、JFH-1 クローン由来の全長 HCV ゲノム RNA を含む レプリコン RNA を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Toray Industries Inc.
Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research

<120> A nucleic acid construct comprising a full-length genome of human Hepatitis C virus, a recombinant cell transfected with the same replicating the full-length virus genome, and a process for producing human Hepatitis C virus particles

<130> P04-0110

<140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 340

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> 5' non-translated region of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<220>

<223> inventor: Wakita, Takaji
Inventor: Kato, Takanobu
Inventor: Date, Tomoko
Inventor: Miyamoto, Michiko
Inventor: Tanabe, Junichi
Inventor: Sone, Saburo

<400> 1

```
accugccccc aauaggggcg acacuccgcc augaaucau cccugugag gaacuacugu 60
cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
ccccucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaugccggg 180
aagacugggu ccuucuugg auaaaccac ucuauccccg gccauuuggg cgugcccccg 240
caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc 340
```

<210> 2

<211> 573

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> core protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 2

```
augagcaciaa auccuaaacc ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg ucgcccagaa 60
gacguuaagu ucccgggagg cggccagauc guuggcggag uauacuuguu gccgcgcagg 120
ggccccaggu ugguugugcg cacgacaagg aaaacuucgg agcgguccca gccacguggg 180
agacgccagc ccauccccaa agaucggcgc uccacuggca aggccugggg aaaaccaggu 240
cgccccuggc ccuauaugg gaaugaggga cucggcuggg caggauaggcu ccugucuccc 300
cgaggcucuc gccccuccug gggccccacu gacccccggc auaggucgcg caacgugggu 360
aaagucaucg acaccuaac guguggcuuu gccgaccuca ugguuacau ccccgucgua 420
ggcgccccgc uuaguggcgc cgccagagcu gucgcgcacg gcgugagagu ccuggaggac 480
gggguuaauu augcaacagg gaaccuaccc gguuucccu uuucuaucuu cuugcuggcc 540
cuguuguccu gcaucaccgu uccggucucu gcu 573
```

<210> 3

<211> 576

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> E1 protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 3

```
gcccagguga agaauaccag uagcagcuac auggugacca augacugcuc caaugacagc 60
aucacuuggc agcucgaggc ugcgguucuc cacguccccc ggugcguccc gugcgagaga 120
guggggaaaua cgucacggug uugggugcca gucucgcaa acauggcugu gcggcagccc 180
ggugcccuca cgcagggucu gcggacgcac aucgauaugg uuugauguc cgccaccuuc 240
ugcucugcuc ucuacuggg ggaccucugu ggcgggguga ugcucgcggc ccagguguuc 300
aucgucucgc cgcaguacca cugguuugug caagaauca auuguccau cuaccucggc 360
accaucacug gacaccgau ggcaugggac augaugaua acuggucgcc cacggccacc 420
augauccugg cguacgugau gcgcgucccc gaggucauca uagacaucgu uagcggggcu 480
cacuggggcg ucauguucgg cuuggccuac uucucuaugc agggagcgug ggcaagguc 540
auugucaucc uucugcuggc cgcuggggug gacgcu 576
```

<210> 4

<211> 1290

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> E2 protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 4

```

ggcaccacca ccguuggagg cgcuguugca cguuccacca acgugauugc cggcguguuc 60
agccauggcc cucagcagaa cauucagcuc auuaacacca acggcaguug gcacaucaac 120
cguacugccu ugaauugcaa ugacuccuug aacaccggcu uucucgcggc cuuguucuac 180
accaaccgcu uuaacucguc agggugucca gggcgccugu ccgccugccg caacaucgag 240
gcuuuccgga uagggugggg caccuacag uacgaggaua augucaccaa uccagaggau 300
augaggccgu acugcuggca cuacccccca aagccgugug gcguaguccc cgcgaggucu 360
guguguggcc caguguacug uuucaccccc agcccguag uagugggcac gaccgacaga 420
cguggagugc ccaccuacac auggggagag aaugagacag augucuuccu acugaacagc 480
acccgaccgc cgcagggcuc augguucggc ugcacgugga ugaacuccac ugguuucacc 540
aagacuugug gcgcgccacc uugccgcacc agagcugacu ucaacgccag cacggacuug 600
uugugcccuu cggaauuuu uaggaagcau ccugaugcca cuuauuuuaa gugugguucu 660
gggcccuggc ucacacaaa gugccugguc cacuaccuu acagacucug gcauuacccc 720
ugcacaguca auuuuaccu cuucaagaua agaauaug uagggggggg uagcacagg 780
cucacggccg caugcaacu cacucguggg gaucgcugcg acuuggagga caggacagg 840
agucagcugu cuccucuguu gcacucuacc acggaauggg ccauccugc cugcaccuac 900
ucagacuac ccgcuuugc aacuggucuu cuccaccuuc accagaacau cguggacgua 960
cauacaugu auggccucuc accugcuac aaaaauacg ucguucgaug ggagugggug 1020
guacucuau uccugcucu agcggacgcc agagucugcg ccugcuugug gaugcuauc 1080
uuguugggcc aggccgaagc agcauuggag aaguuggucg ucuugcacgc ugcgagugcg 1140
gcuaacugcc auggccuccu auauuuugcc aucuucucg uggcagcuug gcacaucagg 1200
ggucgggugg uccccuugac caccuauugc cucacuggcc uauggccuu cugccuacug 1260
cucauggcac ugccccggca ggcuuaugcc 1290

```

<210> 5

<211> 651

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> NS2 protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 5

```

uauagcgcac cugugcacgg acagauaggc guggguuugu ugauauugau caccucucuc 60
acacucaccc cgggguaaua gaccuccuc ggccaguguc uguggugguu gugcuauuc 120
cugacccugg gggaagccau gauucaggag uggguaccac ccaugcaggu gcgcggcgcc 180
cgcgauggca ucgcgugggc cgucacuaua uucugcccgg gugugguguu ugacauuacc 240
aaauggcuuu uggcguugcu ugggccugcu uaccucuuaa gggccgcuuu gacacaugug 300
ccguacuucg ucagagcuca cgcucuguaa aggguaugcg cuuuggugaa gcagcucgcg 360
ggggguaggu auguucaggu ggcgcuaauu gcccuuggca gguggacugg caccuacauc 420
uauagaccac ucacaccuau gucggacugg gccgcuagcg gccugcgca cuuagcgguc 480
gccguggaac ccaucaucu caguccgaug gagaagaagg ucaucgucug gggagcggag 540
acggcugcau guggggacau ucuacaugga cuucccgugu ccgccgacu cggccaggag 600
auccuccug gcccgacuga ugguacacc uccaaggggu ggaagcuccu u 651

```

<210> 6

<211> 1893

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> NS3 protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 6

```
gcucccauca cugcuuauhc ccagcaaaca cgaggccucc ugggcgccau aguggugagu 60
augacggggc gugacaggac agaacaggcc ggggaagucc aaauccuguc cacagucucu 120
caguccuucc ucggaacaac caucucgggg guuuugugga cuguuuacca cggagcuggc 180
aacaagacuc uagccggcuu acgggguccg gucacgcaga uguacucgag ugcugagggg 240
gacuugguag gcuggcccag ccccccuggg accaagucuu uggagccgug caagugugga 300
gccgucgacc uauaucuggu cacgcggaac gcugauguca ucccggcucg gagacgcggg 360
gacaagcggg gagcauugcu cccccgaga cccauuucga ccuugaaggg guccucgggg 420
gggcccggugc ucugcccua gggccacguc guugggcucu uccgagcagc ugugugcucu 480
cggggcgugg ccaauccau cgauuucac cccguugaga cacucgacgu uguuacaagg 540
ucucccacuu ucagugacaa cagcacgcca ccggcugugc cccagaccua ucaggucggg 600
uacuugcaug cuccaacugg caguggaaag agcaccaagg uccugucgc guaugccgcc 660
cagggguaca aaguacuagu gcuaaacc cccguagcug ccaccuggg guuuggggcg 720
uaccuaacca aggcacaug caucaauccc aacauuagga cuggagucag gaccgugaug 780
accggggagg ccaucacgua cuccacauau ggcaauuuc ucgccgaugg gggcugcgcu 840
agcggcgccu augacauc auaucgcga gaaugccacg cuguggaugc uaccuccau 900
cucggcaucg gaacgguccu ugaucagca gagacagccg gggucagacu aacugugcug 960
gcuacggcca cccccccg gucagugaca acccccac ccgauuaga agagguaggc 1020
cucgggcggg agggugagau cccuucua gggagggcga uccccuac cugcaucaag 1080
ggaggagac accugauuuu cugccacua aagaaaaagu gugacgagcu cgcggcgcc 1140
cuucggggca ugggcuugaa ugccguggca uacuauagag gguuggacgu cuccaaua 1200
ccagcucagg gagauguggu ggucgucgcc accgacgcc ucaugacggg guacacugga 1260
gacuuugacu ccgugaucga cugcaaugua gcggucaccc aagcugucga cuucagccug 1320
gacccaccu ucacuaaac cacacagacu gucccacaag acgcugucuc acgcagucag 1380
cgccgcgggc gcacagguag aggaagacag ggcacuuua gguauguuu cacuggugaa 1440
cgagccucag gaauguuga caguguagug cuuugugagu gcuacgacgc aggggcugcg 1500
ugguacgauc ucacaccagc ggagaccacc gucaggcuua gagcgauuu caacacgcc 1560
ggccuacccg ugugucaaga ccaucugaa uuuugggagg caguuuucac cggccucaca 1620
cacauagacg cccacuuccu cuccaaaca aagcaagcgg gggagaacuu cgcguaccua 1680
guagccuacc aagcuacggu gucgcccaga gccaggccc cuccccguc cugggacgcc 1740
auguggaagu gccuggccc acucaagccu acgcuugcgg gcccacacc ucuccuguac 1800
cguuugggcc cuauuacaa ugaggucacc cucacacacc cugggacgaa guacaucgcc 1860
acaugcaugc aagcugaccu ugaggucaug acc 1893
```

<210> 7

<211> 162

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> NS4A protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 7

```
agcacguggg uccuagcugg aggaguccug gcagccgucg ccgcauauug ccuggcgacu 60
ggaugcguuu ccaucaucgg ccgcuugcac gucaaccagc gagucgucgu ugcgccggau 120
aaggaggucc uguaugaggc uuugaugag auggaggaau gc 162
```

<210> 8

<211> 783

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> NS4B protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 8

```
gccucuaggg cggcucucac cgaagagggg cagcggauag ccgagauguu gaaguccaag 60
auccaaggcu ugcugcagca ggccucuaag caggcccagg acauacaacc cgcuaugcag 120
gcuucauggc ccaaagugga acaauuuugg gccagacaca uguggaacuu cauuaagcggc 180
auccaauacc ugcaggauu gucaacacug ccagggaacc ccgcgguggc uuccaugaug 240
gcauucagug ccgccucac caguccguug ugcaccagua ccaccauccu ucucaacauc 300
augggaggcu gguuagcguc ccagaucgca ccacccgcgg gggccaccgg cuuugucguc 360
aguggccugg ugggggcguc cgugggcagc auaggccugg guaaggugcu gguggacauc 420
cuggcaggau auggugcggg cauucgggg gccucgucg cauucaagau caugucuggc 480
gagaagcccu cuauggaaga ugucacuuu cuacugccug ggauccuguc uccgggagcc 540
cugguggugg gggucacug cgcgcccau cugcgccgcc acgugggacc gggggagggc 600
gcgguccaau ggaugaacag gcuuauugcc uuugcuucca gaggaacca cgucgccccu 660
acucacuacg ugacggaguc ggaugcgucg cagcguguga cccaacuacu uggcucucuu 720
acuauaacca gccuacucag aagacuccac aaugggauaa cugaggacug ccccaucca 780
ugc 783
```

<210> 9

<211> 1398

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> NS5A protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 9

```
uccggauccu ggcuccgca cgugugggac ugguuuugca ccaucuugac agacuucaaa 60
aaauggcuga ccucuaaaau guuccccaag cugcccggcc ucccuucau cucuugucua 120
aaggguuaca agggugugug ggccggcacu ggcaucauga ccacgcgcug ccuugcggc 180
gccaacaucu cuggcaaugu ccgccugggc ucuaugagga ucacagggcc uaaaaccugc 240
augaacaccu ggcaggggac cuuuccuauc aaauugcuaca cggagggcca gugcgcgccg 300
aaacccccca cgaacuacaa gaccgccauc uggagggugg cgccucgga guacgcggag 360
gugacgcagc augggucgua cuccuaugua acaggacuga ccacugacaa ucugaaaauu 420
ccuugccaac uaccuucucc agaguuuuuc uccugggugg acggugugca gauccauagg 480
```

```

uuugcaccca caccaaagcc guuuuuccgg gaugaggucu cguucugcgu ugggcuuaau 540
uccuaugcug ucggguccca gcuucccugu gaaccugagc ccgacgcaga cguauugagg 600
uccaugcuaa cagaucggcc ccacaucacg gcggagacug cggcgcgggc cuuggcacgg 660
ggauccaccuc caucugaggc gaguccuca gugagccagc uaucagcacc gucgcugcgg 720
gccaccugca ccaccacag caacaccuau gacguggaca uggucgaugc caaccugcuc 780
auggagggcg guguggcuca gacagagccu gaguccaggg ugcccguucu ggacuucuc 840
gagccaauagg ccgaggaaga gagcgaccuu gagcccuaa uaccaucgga gugcaugcuc 900
cccaggagcg gguuuccacg ggccuuaccg gcuugggcac ggccugacua caaccgccg 960
cucguggaau cguggaggag gccagauuac caaccgcca ccguugcugg uugucucuc 1020
cccccccca agaaggcccc gacgccucc ccaaggagac gccggacagu gggucugagc 1080
gagagcacca uaucagaagc ccuccagaa cuggccauca agaccuuugg ccagcccccc 1140
ucgagcggug augcaggcuc guccacgggg gcgggcgccg ccgaauccgg cgguccgacg 1200
uccccuggug agccggcccc cucagagaca gguuccgccu ccucuaugcc ccccucgag 1260
gggggagccug gagaucggga ccuggagucu gaucagguag agcuucaacc uccccccag 1320
gggggggggg uagcucccg uucgggcucg gggucuuugu cuacuugcuc cgaggaggac 1380
gauaccaccg ugucugc 1398

```

<210> 10

<211> 1773

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> NS5B protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 10

```

uccaugucau acuccuggac cggggcucua auaacucccu guagccccga agaggaaaag 60
uugccaauca acccuuugag uaacucgcug uugcgauacc auaacaaggu guacuguaca 120
acaucaaaga gcgccucaca gagggcuaaa aagguaacuu uugacaggac gcaaugcuc 180
gacgcccauu augacucagu cuuaaaggac auaagcuag cggcuuccaa ggucagcgca 240
aggcuccuca ccuuggagga ggcgugccag uugacuccac cccauucugc aagauccaag 300
uauggauucg gggccaagga gguccgcagc uuguccggga gggccguuaa ccacaucaag 360
uccgugugga aggaccuccu ggaagaccca caaacacca uucccacaac caucauggcc 420
aaaaaugagg uguucugcgu ggaccccgcc aaggggggua agaaaccagc ucgccucauc 480
guuuaccug accucggcgu ccgggucugc gagaaaugg cccucuauga cauuacaca 540
aagcuuccuc aggcgguaau gggagcuucc uauggcuucc aguacuccc ugccaacgg 600
guggaguauc ucuugaaagc augggcggaa aagaaggacc ccauggguuu uucguaugau 660
accggaugcu ucgacucaac cgucacugag agagacauca ggaccgagga guccauauac 720
caggccugcu ccugcccga ggaggccgc acugccauac acucgcugac ugagagacuu 780
uacguaggag ggcccauguu caacagcaag ggucaaaccu gcgguuacag acguugccgc 840
gccagcgggg ugcuuaccac uagcaugggu aacaccauca caugcuauu gaaagccua 900
gcggccugca aggcugcggg gauaguugcg cccacaauugc ugguaugcgg cgaugaccua 960
guagucaucu cagaaagcca ggggacugag gaggacgagc ggaaccugag agccuucacg 1020
gaggccauga ccagguacuc ugccccuccu ggugaucucc ccagaccgga auaugaccug 1080
gagcuauaaa cauccuguuc cucaaauug ucuguggcgu ugggcccgcg gggccgccgc 1140
agauacuacc ugaccagaga cccaaccacu ccacucgcc gggcugccug ggaaacagu 1200
agacacucc cuaucaauuc auggcuggga aacaucaucc aguaugcucc aaccuauug 1260
guucgcaugg uccuaaugac acacuucuc uccaauuca ugguccaaga caccugggac 1320

```



```

cagaaccuca acuuugagau guauggauca guauacuccg ugaauccuuu ggaccuucca 1380
gccauaaauug agagguuaca cgggcuugac gccuuuuuua ugacacacua cucucaccac 1440
gaacugacgc ggguggcuuc agcccucaga aaacuugggg cgccaccccu cagggugugg 1500
aagagucggg cucgcgcagu cagggcgucc cucaucuccc guggagggaag agcggccguu 1560
ugcggccgau aucucuuaa uugggcggug aagaccaagc ucaaacucac uccauugccg 1620
gaggcgcgcc uacuggacu uuccaguugg uucaccgucg gcgccggcgg gggcgacauu 1680
uuucacagcg ugucgcgcgc ccgaccccg cgcaccccg ucauuacucu ucggccuacu ccuacuuuuc 1740
guagggguag gccucuuccu acuccccgcg cgg

```

<210> 11
 <211> 239
 <212> RNA
 <213> Hepatitis C virus

<220>
 <223> 3' non-translated region of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

```

<400> 11
uagagcggca cacacuaggu acacuccaua gcuaacuguu cccccuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu cccucuuucu ucccuucua 120
ucuuauucua cuuucuuucu ugguggcucc aucuuagccc uagucacggc uagcugugaa 180
agguccguga gccgcaugac ugcagagagu gccguaacug gucucucugc agaauaugu 239

```

<210> 12
 <211> 9707
 <212> RNA
 <213> Hepatitis C virus

<220>
 <223> full-length Hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

```

<400> 12
gaauucuaau acgacucacu auagaccugc cccuaauagg ggcgacacuc cgccaugaau 60
cacuccccug ugaggaacua cugucuucac gcagaaagcg ccuagccaug gcguuaguau 120
gagugucgua cagccuccag gcccccccu cccgggagag ccuaguggu cugcggaaac 180
ggugaguaca ccggaauugc cgggaagacu ggguccuuuc uuggauaaac ccacucuaug 240
cccggccauu ugggcgugcc cccgcaagac ugcuaagccga guagcguugg guugcgaaag 300
gccuuguggu acugccugau agggcgcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug 360
caccaugagc acaaauccua aaccucaaag aaaaacaaa agaaacacca accgucgccc 420
agaagacguu aaguucccg ggcgcggcca gaucguuggc ggaguauacu uguugccgcg 480
caggggcccc agguugggug ugcgcacgac aaggaaaacu ucggagcggu ccagccacg 540
ugggagacgc cagcccaucc ccaaagauc gcgcuccacu ggcaaggccu ggggaaaacc 600
aggucgcccc uggcccuau augggauga gggacucggc ugggcaggau ggcuccuguc 660
cccccgaggc ucucgccccu ccuggggccc cacugacccc cggcauaggu cgcgcaacgu 720
ggguaaaguc aucgacaccc uaacgugugg cuuugccgac cucauggggu acauccccgu 780
cguaggcgcc ccgcuuagug gcgccgccag agcugucgcg cacggcguga gaguccguga 840
ggacgggguu aaauaugcaa cagggaaccu acccgguuuc cccuuuuuua ucuucuugcu 900

```

ggcccuguug uccugcauca ccguuccggu cucugcugcc caggugaaga auaccaguag 960
 cagcuacaug gugaccaaug acugcuccaa ugacagcauc acuuggcagc ucgaggcugc 1020
 gguuccacac guccccgggu gcgucgggug cgagagagug gggaauacgu cacgguguug 1080
 ggugccaguc ucgcccaca uggcugugcg gcagcccggu gccucacgc agggucugcg 1140
 gacgcacauc gauaugguug ugauguccgc caccuucugc ucugcucucu acguggggga 1200
 ccucuguggc ggggugaugc ucgcggccca gguguucauc gucugccgc aguaccacug 1260
 guuugugcaa gaaugcauuu gcuccaucua ccugggcacc aucacuggac accgcauggc 1320
 auggggacau augaugaacu ggucggccac ggccaccaug auccuggcgu acgugaugcg 1380
 cgucggcgag gucaucauag acaucguuag cggggcucac uggggcgua uguucggcuu 1440
 ggccuacuuc ucuaugcagg gagcgugggc gaaggucuu gucauccuuc ugcuggccgc 1500
 ugggguggac gcgggcacca ccaccguugg aggcgcuguu gcacguucca ccaacgugau 1560
 ugccggcgug uucagccaug gccucagca gaacauucag cucauuaca ccaacggcag 1620
 uuggcacauc aaccguacug ccuugaauug caaugacucc uugaacaccg gcuuucugc 1680
 ggccuuguuc uacaccaacc gcuuaacuc gucaggguu ccaggcgcc ugucggccug 1740
 ccgcaacauc gaggcuuuc ggauagggu gggcaccua caguacgagg auaugucac 1800
 caauccagag gauaugaggc cguacugcug gcacuacccc ccaaagccgu guggcguagu 1860
 ccccgcgagg ucugugugug gccagugua cuguuaccc cccagcccgg uaguaguggg 1920
 cagcaccgac agacguggag ugcccaccua cacauaggga gagaugaga cagaugucu 1980
 ccuacugaac agcaccgac cgccgcaggg cucaugguuc ggugcacgu ggaugaacuc 2040
 cacugguuuc accaagacu guggcgcgcc accuugccgc accagagcug acucaacgc 2100
 cagcacggac uuguugugcc cuacggauug uuuuaggaag cauccugaug ccacuuauau 2160
 uaaguguggu ucugggccc ggucacaccc aaagugccug guccacuacc cuuacagacu 2220
 cuggcauuac ccugcacag ucauuuuac caucuuaag auagaauu auguagggg 2280
 gguugagcac aggcucacgg ccgcaugcaa cuucacucgu ggggaucgu gcgacuugga 2340
 ggacagggac aggagucagc ugucuccucu guugcacucu accacggaau gggccauccu 2400
 gccugcacc uacucagacu uacccgcuu gucaacuggu cuucuccacc uucaccagaa 2460
 caucguggac guacaauaca uguauggccu cucaccugcu aucacaaaau acgucguucg 2520
 augggagugg gugguacucu uauuccugcu cuuagcggac gccagagucu gcgccugcuu 2580
 guggaugcuc aucuuguugg gccaggccga agcagcauug gagaaguugg ucgucuugca 2640
 cgcugcgagu gcggcuacu gccaugccu ccuauuuu gccaucuuc ucguggcagc 2700
 uuggcacauc aggggucggg uggucccuu gaccaccuau ugccucacug gccuaggcc 2760
 cuucugccua cugcuaugg cacugccccg gcaggcuuau gccuagacg caccugugca 2820
 cggacagaua ggcguggguu uguugauuu gaucaccuc uucacacua cccggggua 2880
 uaagaccuc cucggccagu gucuguggug guugucua cuccugacc ugggggaagc 2940
 caugauucag gaguggguac caccuagca ggugcgcg gcgcggaug gcaucgcgug 3000
 ggccgucacu auauucugcc cggguguggu guuugacau accaaauggc uuuuggcguu 3060
 gcuugggccc gcuuaccucu uaaggccgc uuugacacau gugccguacu ucgucagagc 3120
 ucacgcucug auaggguau gcgcuuuggu gaagcagcuc gcggggggu gguauguua 3180
 gguggcgcu uuggcccuug gcagguggac uggcaccuac aucuagacc accucacacc 3240
 uaugucggac uggggcgua gcggccugcg cgacuagcg gucggcgugg aaccuacau 3300
 cuucaguccg auggagaaga aggucaucgu cuggggagcg gagacggcug caugugggga 3360
 cauucacau ggacuucccg ugucggccg acucggccag gagauccuc ucggcccagc 3420
 ugauggcuac accuccaagg gguggaagcu ccuugcucc aucacugcu augcccagca 3480
 aacacgaggc cuccugggcg ccuaguggu gaguagacg gggcgugaca ggacagaaca 3540
 ggccggggaa guccaaauc uguccacagu cucucagucc uuccucggaa caaccuuc 3600
 ggggguuuug uggacuuuu accacggagc uggcaacaag acucuagccg gcuuacgggg 3660
 uccggucacg cagauguacu cgagugcuga gggggacuug guaggcuggc ccagcccccc 3720
 ugggaccaag ucuuuggagc cgugcaagug uggagccguc gaccuauuc uggucacgcg 3780
 gaacgcugau gucauccgg cucggagacg cggggacaag cggggagcau ugcucuccc 3840
 gagacccau ucgaccuuga agggguccuc gggggggccg gugcucugcc cuaggggcca 3900

cgucguuggg cucuuccgag cagcugugug cucucggggc guggccaaau ccaucgauuu 3960
 cauccccguu gagacacucg acguuguuac aaggucucc acuuucagug acaacagcac 4020
 gccaccggcu guggcccaga ccuauaggu cggguacuug caugcuccaa cuggcagugg 4080
 aaagagcacc aaggucuccug ucgcguaugc cgcccagggg uacaaaguac uagugcuuaa 4140
 cccucggua gcugccaccc ugguuuugg ggcguaccua uccaaggcac auggcauca 4200
 uccaacauu aggacuggag ucaggaccgu gaugaccggg gaggccauca cguacuccac 4260
 auauggcaaa uuucucgccg augggggcug cgcuagcggc gccuagaca ucaucauug 4320
 cgaugaaugc cacgcugugg augcuaccuc cauucucggc aucggaacgg uccuugauca 4380
 agcagagaca gccgggguca gacuaacugu gcuggcuacg gccacacccc ccgggucagu 4440
 gacaaccccc caucccgaua uagaagaggu aggcucggg cgggagggug agaucccuu 4500
 cuaugggagg gcgauuccc uaucugcau caaggagggg agacaccuga uuucugcca 4560
 cucaaagaaa aagugugacg agcucgcggc ggccuucgg ggcaugggcu ugaugccgu 4620
 ggcauacuau agaggguugg acgucuccau aaucaccagcu cagggagauug ugguggucgu 4680
 cgccaccgac gcccucauga cggguuacac uggagacuuu gacuccguga ucgacugca 4740
 uguagcgguc acccaagcug ucgacuucag ccuggacccc accuucacua uaaccacaca 4800
 gacugucca caagacgcug ucucacgcag ucagcgccg gggcgcacag guagaggaag 4860
 acagggcacu uauagguaug uuuccacugg ugaacgagcc ucaggaaugu uugacagugu 4920
 agugcuuugu gagugcuacg acgcaggggc ugcgugguac gaucucacac cagcggagac 4980
 caccgucagg cuuagagcgu auuuaacac gcccgccua cccgugugc aagaccauc 5040
 ugaauuuugg gaggcaguuu ucaccggccu cacacacua gacgccacu uccucucca 5100
 aacaaagcaa gcgggggaga acucgcgua ccuaguagcc uaccaagcu cggugugcg 5160
 cagagccaag gcccucucc cguccuggga cgccaugugg aagugccugg ccgacucua 5220
 gccuacguu gcggggccca caccucuccu guaccguuug ggcccuaua ccaaugaggu 5280
 caccucaca caccuggga cgaaguacau cgccacaugc augcaagcug accuugaggu 5340
 caugaccagc acgugggucc uagcuggagg aguccuggca gccgucgccg cauauugccu 5400
 ggcgacugga ugcguuucca ucaucggccg cuugcacguc aaccagcgag ucgucguugc 5460
 gccggauaag gagguccugu augaggcuu ugaugagaug gaggaauugc ccucuauggc 5520
 ggcucucauc gaagaggggc agcggaugc cgagauguug aaguccaaga uccaaggcu 5580
 gcugcagcag gccucuaagc agggccagga cauacaacc gcuaugcagg cuucauggcc 5640
 caaaguggaa caauuuugg ccagacacau guggaaciuc auuagcggca uccaauaccu 5700
 cgaggaauug ucaacacugc cagggaacc cgcgugggcu uccaugaug cauucagugc 5760
 cgcccucacc aguccguuug cgaccaguac caccuuccu cucaacaua ugggagggcug 5820
 guuagcgucc cagaucgcac ccccgcggg ggccaccggc uuugucguca guggccuggu 5880
 gggggcugcc gugggcagca uaggccuggg uaaggugcug guggacaucc uggcaggaua 5940
 uggugcgggc auuucggggg ccucgucgc auucaagauc augucggcg agaagcccuc 6000
 uauggaagau gucaucauac uacugccugg gaucugucu ccgggagccc uggugguggg 6060
 ggucaucugc gcggccauuc ugcgcccca cgugggaccg ggggagggcg cgguccaug 6120
 gaugaacagg cuuauugccu uugcuuccag aggaaccac gucgcccua cucacuacgu 6180
 gacggagucg gaugcguccg agcgugugac ccaacuacuu ggcucucuua cuauaaccag 6240
 ccuacucaga agacuccaca auuggauaac ugaggacugc ccaucccau gcuccggau 6300
 cuggcuccgc gacguguggg acuggguuug caccuucug acagacuua aaaauggcu 6360
 gaccucuaaa uuuguccca agcugcccgg ccucccuuc aucucuugc aaaaggggua 6420
 caaggguug ugggccggca cuggcaucau gaccacgcg ugcccuugcg gcgccaacau 6480
 cucuggcaau guccgccugg gcucuaugag gaucacagg ccuaaaaccu gcaugaacac 6540
 cuggcagggg accuuuccua ucaauugcua cacggagggc cagugcgcg cgaaacccc 6600
 cacgaacuac aagaccgcca ucuggagggu ggcggccucg gaguacgcgg agguagcgca 6660
 gcaugggucg uacuccuau uaacaggacu gaccacugac aaucugaaa uccuugcca 6720
 acuaccuuc ccagaguuu ucuccugggu ggacggugug cagauccaua gguuugcacc 6780
 cacacaaag ccguuuuucc gggaugaggu cucguucug guugggcua auuccuagc 6840
 ugucgggucc cagcuuccu gugaaccuga gcccgacgca gacguauuga gguccaugcu 6900

aacagaucg cccacauca cggcgagac ugcggcgcg cgcuggcac ggggaucacc 6960
 uccaucugag gcgaguccu cagugagcca gcuaucagca ccgucgcugc gggccaccug 7020
 caccacccac agcaacaccu augacgugga cauggucgau gccaaccugc ucauggaggg 7080
 cgguguggcu cagacagagc cugaguccag ggugcccguu cuggacuuc ucgagccaau 7140
 ggccgaggaa gagagcgacc uugagcccuc aaauaccaucg gagugcaugc ucccaggag 7200
 cggguuucca cgggcuuac cggcuugggc acggccugac uacaaccgc cgcucgugga 7260
 aucguggagg aggccagauu accaaccgcc caccguugcu gguugugcuc ucccccccc 7320
 caagaaggcc ccgacgccuc cccaaggag acggcgaca gugggucuga gcgagagcac 7380
 cauaucagaa gccuccagc aacuggccau caagaccuuu ggccagcccc ccucgagcgg 7440
 ugaugcaggc ucguccacgg gggcgggcg cgccgaaucc ggcgguccga cgucccugg 7500
 ugagccggcc ccucagaga cagguuccgc cuccucaug cccccucg agggggagcc 7560
 uggagaucg gaccuggagu cugaucaggu agagcucaa ccucccccc aggggggggg 7620
 gguagucucc gguucgggcu cggggucuu gucuacuugc uccgaggagg acgauaccac 7680
 cgugugcugc uccaugucau acuccggac cggggcucua auaacuccu guagccccga 7740
 agaggaaaag uugccauca accuuugag uaacucgucg uugcgauacc auaacaaggu 7800
 guacuguaca acaucaaaag gcgccucaca gagggcuaaa aagguaacuu uugacaggac 7860
 gcaugucuc gacgcccau augacucagu cuuaaggac aucaagcuag cggcuuccaa 7920
 ggucagcgca aggcuccuca ccuuggagga ggcgugccag uugacuccac ccauucugc 7980
 aagaucuaag uauggauucg gggccaagga gguccgcagc uuguccggga gggccguuaa 8040
 ccacaucaag uccgugugga aggaccuccu ggaagacca caaacacaa uucccacaac 8100
 caucauggcc aaaaauagg uguucugcg ggaccccgcc aaggggggua agaaaccagc 8160
 ucgccuac guuuaccuc accucggcg ccgggucugc gagaaaugg ccucuauga 8220
 cauacacaa aagcuuccuc aggcgguaau gggagcuucc uauggcuucc aguacuccc 8280
 ugccaacgg guggagauuc ucuugaaagc augggcgga aagaaggacc ccauggguu 8340
 uucguaugau acccgauuc ucgacucaac cgucacugag agagacauca ggaccgagga 8400
 guccauauac caggccugcu ccugcccga ggaggccgc acugccauac acucgugac 8460
 ugagagacu uacguaggag ggcccaugu caacagcaag ggucaaaccu gcgguuacag 8520
 acguugccgc gccagcgggg ugcuaaccac uagcaugggu aacaccau caugcuau 8580
 gaaagccua gcggccugca aggcugcggg gauaguugcg cccacaugc ugguaugcgg 8640
 cgaugaccua guagucauc cagaaagcca ggggacugag gaggacgagc ggaaccugag 8700
 agccuucacg gaggccauga ccagguacuc ugccccuccu ggugaucucc ccagaccgga 8760
 auaugaccug gagcuauaa cauccuguuc cucaaauug ucuguggcgu uggggccgcg 8820
 gggccgccc agauacuacc ugaccagaga ccaaccacu ccacucgccc gggcugccug 8880
 ggaaacaguu agacacucc cuaucaauuc auggcuggga aacaucauc aguaugcucc 8940
 aaccuauagg guucgcaugg uccuaaugac acacuucuc uccauucua ugguccaaga 9000
 caccucggac cagaaccuca acuuugagau guauggauca guauacuccg ugaauccuuu 9060
 ggaccuucca gccauaaug agagguuaca cgggcuugac gccuuuucua ugcacacaua 9120
 cucucaccac gaacugacgc ggguggcuc agcccucaga aaacuugggg cgccaccucc 9180
 cagguguggg aagagucggg cucgcgcagu cagggcgucc cucaucuccc guggaggga 9240
 agcggccguu ugcggccgau aucucucaa uugggcggug aagaccaagc ucaaacucac 9300
 uccauugccg gaggcgcgcc uacuggacu auccaguug uucaccguc gcgccggcg 9360
 gggcgacauu uuucacagcg ugucgcgcgc ccgacccgc ucauuacuc ucggccuacu 9420
 ccuacuuuuc guagggguag gccuucucc acucccgcu cgguaagagcg gcacacaua 9480
 gguacacucc auagcuacu guuccuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 9540
 uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuccucuu ucuuccuuc ucaucuuuu cuacuucuu 9600
 ucuuggugc uccaucuuag ccuagucac ggcuaugcugu gaaagguccg ugagccgcau 9660
 gacugcagag agugccguaa cuggucucuc ugcagauc au gcuaga 9707

<211> 11111

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: replicon RNA comprising full-length Hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 13

```
accugccccc aaauaggggacg acacuccgcc augaauacacu ccccuugugag gaacuacugu 60
cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
ccccuccccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaaugccggg 180
aagacugggu ccuuucuuugg auaaacccac ucuaugcccg gccauuuggg cgugcccccg 240
caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg ucgcccuaug auugaacaag auggauugca 420
cgcagguucu ccggccgcuu gggugggagag gcuaauccggc uaugacuggg cacaacagac 480
aaucggcugc ucugaugccg ccguguuccg gcugucagcg caggggccc cgguuuuuu 540
ugucaagacc gaccuguccg gugcccugaa ugaacugcag gacgaggcag cgcggcuau 600
guggcugggc acgacgggacg uuccuugcgc agcugugcuc gacguuguca cugaagcggg 660
aagggaugcug cugcuauugg gcgaagugcc ggggcaggau cuccugucau cucaccuugc 720
uccugccgag aaaguaacca ucauggcuga ugcaauccgg cggcugcaua cguuugaacc 780
ggcuaccugc ccuuucgacc accaagcgaa acaucgcauc gagcgcagc guacucggau 840
ggaaagccgu cuugucgauc aggaugaucu ggacgaagag caucaggggc ucgcgccagc 900
cgaacuguuu gccaggcuca aggcgcgcua gcccgcggc gaggaucucg ucgugaccca 960
uggcgaugcc ugcuugccga auaucauggu ggaaaauagg cgcuuuucug gauucaucga 1020
cuguggcccg cugggugugg cggaccgcua ucaggacaua gcguuggcua cccgugauau 1080
ugcuagaagc cuuggcggcg aaugggcuga ccgcuuccuc gugcuuuacg guaucgccgc 1140
ucccgauucg cagcgcuauc ccuucuaucg ccuucuuagc gaguucuuu gaguuuaaac 1200
ccucucccuc ccccccccu aacguuacug gccgaagccg cuuggaauaa ggccggugug 1260
cguuugucua uauuuuuuu uccaccauau ugccgucuuu uggcaaugug agggcccggg 1320
aaccuggccc ugucuuucug acgagcauuc cuagggguc uuccccucuc gccaaaggaa 1380
ugcaaggucg guugaauugc gugaaggag caguuccuc ggaagcuuc ugaagacaaa 1440
caacgucugu agcgaccuuu ugcaggcagc ggaaccccc accuggcgac agguccucu 1500
gcggccaaaa gccacgugua uaagauacac cugcaaggc ggcacaacc cagugccacg 1560
uugugaguuu gauaguugc gaaagaguc aauggcucuc cucaagcgu uucaacaagg 1620
ggcugaaggga ugcccagaag guaccccau guaugggauc ugaucugggg ccucggugca 1680
caugcuuuac auguuguuag ucgagguuaa aaaaacguc agggccccc aaccacgggg 1740
acgugguuuu ccuuugaaaa acacgaugau accaugagca caaauccua accucaaaaga 1800
aaaacaaaaa gaaacaccaa ccgucgcca gaagacguu aguucccggg cggcggccag 1860
aucguuggcg gaguauacuu guugccgcgc aggggcccc gguugggugu gcgcacgaca 1920
aggaaaacuu cggagcgguc ccagccacgu gggagacgcc agcccaucc caaagaucgg 1980
cgcuccacug gcaaggccug gggaaaacca ggucgcccc ggccccuaa ugggaaugag 2040
ggacucggcu gggcaggau gcuuccuguc cccgaggcu cucgcccuc cuggggccc 2100
acugacccc ggcuaagguc gcgcaacgug gguaaaguc ucgacaccu aacgugggc 2160
uuugccgacc ucauggggua caucccguc guaggcgccc cgcuuagugg cggcgccaga 2220
gcugucgcgc acggcgugag aguccuggag gacggggua auuaugcaac aggggaaccua 2280
cccgguuucc ccuuuucua cuucuuugc gcccuguugu ccugcaucac cguuccgguc 2340
ucugcugccc agguagaaga uaccaguag agcuacaugg ugaccaauga cugcucaau 2400
gacagcauca cuuggcagcu cgaggcugcg guuccaccg ucccgggug cgucccgugc 2460
```

gagagagugg ggaauacguc acgguguugg gugccagucu cgccaaacau ggcugugcgg 2520
 cagcccggug cccucacgca gggucugcgg acgcacaucg auauugguugu gauguccgcc 2580
 accuucugcu cugcucucua cgugggggac cucugugcg gggugaugcu cgcggcccag 2640
 guguucaucg ucucgccgca guaccacugg uuugugcaag aaugcaauug cuccaucuc 2700
 ccuggcacca ucacuggaca ccgcauggca ugggacauga ugaugaacug gucgcccacg 2760
 gccaccauga uccuggcgua cgugaugcgc guccccgagg ucaucauaga caucguuagc 2820
 ggggucacu ggggucguc guucggcuug gccuacuucu cuaugcaggg agcgugggagc 2880
 aaggucauug ucauccuucu gcuggccgcu gggguggagc cgggcaccac caccguugga 2940
 ggcgcuguug cacguuccac caacgugauu gccggcgugu ucagccaugg cccucagcag 3000
 aacauucagc ucauuacac caacggcagu uggcacauga accguacugc cuugaauugc 3060
 aaugacuccu ugaacaccgg cuuucucgcg gccuuguucu acaccaaccg cuuuacucg 3120
 ucaggguugc caggggcgccu guccgccugc cgcaacaucg aggcuuuccg gauagggugg 3180
 ggcacccuac aguacgagga uaaugucacc aauccagagg auaugaggcc guacugcugg 3240
 cacuaccccc caaagccgug uggcgugagc cccgcgaggu cugugugugg cccaguguac 3300
 uguuucaccc ccagcccggg aguagugggc acgaccgaca gacguggagu gccaccuac 3360
 acauggggag agaauagac agaugucuuc cuacugaaca gcacccgacc gccgcagggc 3420
 ucaugguucg gcugcacgug gaugaacucc acugguuua ccaagacuug uggcgcgcca 3480
 ccuugccgca ccagagcuga cuucaacgcc agcacggacu uguugugccc uacggauugu 3540
 uuuagggaagc auccugaugc cacuuauuu aagugugguu cugggcccug gcucacacca 3600
 aagugccugg uccacuaccc uuacagacuc uggcauuacc ccugcacagu cauuuuuacc 3660
 aucuucaga uaagaauua uguagggggg guugagcaca ggcucacggc cgcaugcaac 3720
 uucacucgug gggauccgug cgacuuggag gacagggaca ggagucagcu gucuccucug 3780
 uugcacucua ccacggaug ggccauccug ccugcaccu acucagacu acccgcuug 3840
 ucaacugguc uucuccaccu ucaccagaac aucguggagc uacaauacau guauggccuc 3900
 ucaccugcua ucacaaaaua cgucguucga ugggaguggg ugguacucu auuccugcuc 3960
 uuagcggagc ccagagucug cgccugcuug uggauugcua ucuuguuggg ccaggccgaa 4020
 gcagcauugg agaaguuggu cgucuugcac gcugcgagug cggcuaacug ccauggccuc 4080
 cuauauuuug ccaucuucu cguggcagcu uggcacauga ggggucgggu ggucuccuug 4140
 accaccuauu gccucacugg ccuauggccc uucugccuac ugcucauggc acugccccgg 4200
 caggcuuauu ccuauagcgc accugugcac ggacagauag gcguggguuu guugauauug 4260
 aucaccucuc ucacacucac cccggggauu aagaccucc ucggccagug ucuguggugg 4320
 uuugcuauc uccugacccu ggggggaagc augauucagg aguggguacc acccaugcag 4380
 gugcgcgcg gccgcgaugg caucgcgugg gccgucacua uauucugccc ggguguggug 4440
 uuugacauua ccaauuggcu uuuggcguug cuugggcccug cuuaccucu aagggccgcu 4500
 uugacacaug ugccguacu cgucagagcu cacgcucuga uaaggguaug cgcuuuggug 4560
 aagcagcucg cgggggguag guauguucag guggcgcuau uggcccuugg cagguggacu 4620
 ggcaccuaca ucaugacca ccucacaccu augucggacu gggccgcuag cggccugcg 4680
 gacuuagcgg ucgccgugga acccauacuc uucaguccga uggagaagaa ggucaucguc 4740
 uggggagcgg agacggcugc auguggggac auucuacau gacuucccg guccgccga 4800
 cucggccagg agauccuccu cggcccagcu gauggcuaca ccuccaaggg guggaagcuc 4860
 cuugcucca ucacugcuua ugcccagcaa acacgaggcc uccugggagc cauaguggug 4920
 agauagcgg ggcgugacag gacagaacag gccggggaag uccaaauccu guccacaguc 4980
 ucucaguccu uccucggaac aaccaucuc gggguuuugu ggacuguuuu ccacggagcu 5040
 ggcaacaaga cucuagccgg cuuacggggu ccgguacgc agauguacuc gagugcugag 5100
 ggggacuugg uaggcuggcc cagcccccu gggaccaagu cuuuggagcc gugcaagugu 5160
 ggagccgucg accuauaucu ggucacgcgg aacgcugaug ucaucccgcc ucggagacgc 5220
 ggggacaagc ggggagcauu gcucuccccg agaccuauu cgaccuugaa gggguccucg 5280
 gggggggccg ugcucugccc uaggggccac gucguugggc ucuuccgagc agcuguguc 5340
 ucucggggcg uggccaauc caucgauuuc auccccguug agacacucga cguuguuaca 5400
 agguuccca cuuucaguga caacagcacg ccaccggcug ugcccagac cuaucagguc 5460

ggguacuugc augcuccaac uggcagugga aagagcacca aggucccugu cgcguaugcc 5520
 gcccaggggu acaaaguacu agugcuuaac cccucgguaug cugccacccu gggguuuggg 5580
 gcguaccuau ccaaggcaca uggcaucaau cccaacauua ggacuggagu caggaccgug 5640
 augaccgggg aggccaucac guacuccaca uauggcaaau uucucgccga ugggggcuugc 5700
 gcuagcggcg ccuaugacau caucauugc gaugaaugcc acgcugugga ugcuaaccucc 5760
 auucucggca ucggaacggu ccuugaucaa gcagagacag ccggggucag acuaacugug 5820
 cuggcuacgg ccacaccccc cgggucagug acaaccccc aucccgauau agaagaggua 5880
 ggccucgggc gggaggguga gaucccuuc uaugggaggg cgauuucccu auccugcauc 5940
 aaggggaggga gacaccugau uuucugccac ucaaagaaaa agugugacga gcucgcggcg 6000
 gcccuucggg gcaugggcuu gaauccgug gcauacuaua gagguugga cgucuccaua 6060
 auaccagcuc aggggagauu gguggucguc gccaccgacg ccucaugac gggguacacu 6120
 ggagacuug acuccgugau cgacugcaau guagcggua cccaagcugu cgacuucagc 6180
 cuggaccca ccuucacuau aaccacacag acuguccac aagacgcugu cucacgcagu 6240
 cagcgccgcg ggcgcacagg uagaggaaga cagggcacuu auagguaugu uccacuggu 6300
 gaacgagccu caggaauguu ugacagugua gugcuuugug agugcuacga cgcaggggcu 6360
 gcgugguacg aucucacacc agcggagacc accgucaggc uuagagcgu uuucaacacg 6420
 cccggccuac ccgugugua agaccauuu gaauuuuggg aggcaguuu caccggccuc 6480
 acacacauag acgcccacuu ccucuccaa acaaagcaag cgggggagaa cuucgcguac 6540
 cuaguagccu accaagcuac ggugugcgcc agagccaagg cccuuccccc guccugggac 6600
 gccauugga agugccuggc ccgacuaag ccuacgcuug cgggccccac accucuccug 6660
 uaccguuugg gcccuauuac caaugagguc accucacac acccugggac gaaguacau 6720
 gccacaugca ugcaagcuga ccuugagguc augaccagca cguggguccu agcuggagga 6780
 guccuggcag ccgucgccgc auauugccug gcgacuggau gcguuuccau caucggccgc 6840
 uugcacguca accagcgagu cgucguugcg ccggauaagg agguccugua ugaggcuuu 6900
 gaugagaugg aggaauugcg cucuagggcg gcucucaucg aagaggggca gcggauagcc 6960
 gagauguuga aguccaagau ccaaggcuug cugcagcagg ccucuaagca ggcccaggac 7020
 auacaacccg cuaugcaggc uucauggccc aaaguggaac auuuuugggc cagacacau 7080
 uggaacuua uuagcggcau ccaauaccuc gcaggauugu caacacugcc agggaacccc 7140
 gcgguggcuu ccaugauggc auucagugcc gccucacca guccguuguc gaccaguacc 7200
 accauccuuc ucaacaucau gggaggcugg uuagcgucc agaucgcacc acccgcgggg 7260
 gccaccggcu uuugcugcag uggccuggug ggggucgccc ugggcagcau aggcucgggu 7320
 aaggugcugg uggacaucuu ggcaggauau ggugcgggca uuucgggggc ccucgucgca 7380
 uucaagauga ugucuggcga gaagcccucu auggaagau ucaucaauu acugccuggg 7440
 auccugucuc cgggagcccu ggugguuggg gucaucugcg cggccauuc gcgccccac 7500
 gugggaccgg gggaggcgcc gguccaauug augaacaggc uuauugccu ugcuaaccaga 7560
 ggaaaccacg ucgcccucac ucacuacgug acggagucgg augcgucgca gcgugugacc 7620
 caacuacuug gcucucuuac uauaaccagc cuacucagaa gacuccaaa uuggauaau 7680
 gaggacugcc ccaucccaug cuccggauc uggcuccgcg acguguggga cuggguuugc 7740
 accauuuga cagacuuaa aaauuggcug accucuaaa uuuucccaa gcugcccggc 7800
 cucccuua ucucuugua aaaggguuac aaggguugu gggccggcac uggcauag 7860
 accacgcgc gcccuugcgg cgccaacau ucuggcaaug uccgccuggg cucuaugagg 7920
 aucacagggc cuaaaaccug caugaacacc uggcagggga ccuuuccuau caauugcuac 7980
 acggaggggc agugcgcgcc gaaaccccc acgaacuaca agaccgccau cuggagggug 8040
 gcggccucgg aguacgcgga ggugacgcag caugggucgu acuccuauu aacaggacug 8100
 accacugaca aucugaaaau uccuugccaa cuaccuucuc cagaguuuu cuccugggug 8160
 gacggugugc agauccauag guuugcacc acaccaaagc cguuuuuccg ggauaggug 8220
 ucguucugcg uugggcuuaa uuuccuauug gucggguccc agcuuccug ugaaccugag 8280
 cccgacgcag acguauugag guccaugcu acagaucgc cccacauac ggcggagacu 8340
 gcggcgcgcc gcuuggcacg gggauaccu ccaucugagg cgagcuccuc agugagccag 8400
 cuaucagcac cgucgcugcg ggccaccugc accaccaca gcaacaccua ugacuggac 8460

auggucgaug ccaaccugcu cauggagggc gguguggcuc agacagagcc ugaguccagg 8520
 gugcccguuc uggacuucuc cgagccaaug gccgaggaag agagcgaccu ugagcccuca 8580
 auaccaucgg agugcaugcu ccccaggagc ggguuuccac gggccuuacc ggcuugggca 8640
 cggccugacu acaaccgccc gcucguggaa ucguggagga ggccagauua ccaaccgccc 8700
 accguugcug guugugcucu ccccccccc aagaaggccc cgacgccucc cccaaggaga 8760
 cgccggacag ugggucugag cgagagcacc auaucagaag ccuccagca acuggccauc 8820
 aagaccuuug gccagcccc cucgagcggg gaugcaggcu cguccacggg ggcgggcgcc 8880
 gccgaauccg gcgguccgac guccccuggu gagccggccc ccucagagac agguuccgcc 8940
 uccucuaugc cccccucga ggggggagccu ggagaucgg accuggaguc ugaucaggua 9000
 gagcuucaac cucccccca gggggggggg guagcuccg guucgggcuc ggggucuuug 9060
 ucuacuugcu ccgaggagga cgauaccacc gugugcugcu ccaugucaua cuccuggacc 9120
 ggggcucuaa uaacucccug uagccccgaa gaggaaaagu ugccaauca cccuuagagu 9180
 aacucgcugu ugcgauacca uaacaaggug uacuguacaa caucaaagag cgccucacag 9240
 agggcuaaaa agguaacuuu ugacaggacg caaugcucg acgcccuaa ugacucaguc 9300
 uuaaaggaca ucaagcuagc ggcuuccaag gucagcga ggcuccucac cuuggaggag 9360
 gcgugccagu ugacuccacc ccauucugca agauccaagu auggauucgg ggccaaggag 9420
 guccgcagcu uguccgggag ggccguuaac cacaucaagu ccguguggaa ggaccuccug 9480
 gaagaccac aaacaccau ucccacaacc aucauggcca aaaaugaggu guucugcgug 9540
 gaccccgcca agggggguua gaaaccagcu cgccucaucg uuuaccuga ccucggcguc 9600
 cgggucugcg agaaauggc ccucuaugac auuacacaaa agcuuccuca ggcgguaaug 9660
 ggagcuuccu auggcuucca guacucccu gcccaacggg uggaguaucu cuugaaagca 9720
 ugggcggaaa agaaggacc cauggguuu ucguaugaua cccgaugcuu cgacucaacc 9780
 gucacugaga gagacaucag gaccgaggag uccauauacc aggcucguc ccugcccag 9840
 gaggcccgc cugccauaca cucgcugacu gagagacuuu acguaggagg gcccauguuc 9900
 aacagcaagg gucaaacucg cgguuacaga cguugccgcg ccagcggggu gcuaaccacu 9960
 agcaugggua acaccaucac augcuauug aaagcccuag cggccugcaa ggcugcgggg 10020
 auaguugcgc ccacaaugcu gguaugcggc gaugaccuag uagucaucuc agaaagccag 10080
 gggacugagg aggacgagcg gaaccugaga gccuucacgg aggccaugac cagguacucu 10140
 gcccuccug gugaucccc cagaccggaa uaugaccug agcuauaac auccuguucc 10200
 ucaaaugugu cuguggcguu gggcccgcgg ggccgccgca gauacuaccu gaccagagac 10260
 ccaaccacuc cacucgcccg ggcugccugg gaaacaguua gacacuccc uaucaauuca 10320
 uggcugggaa acaucaucca guaugcucca accauauggg uucgcauggu ccuaaugaca 10380
 cacuucuuu ccuucucuu gguccaagac acccuggacc agaaccucaa cuuugagau 10440
 uauggaucag uauacuccg gaauccuuug gaccuuccag ccauaauuga gagguuacac 10500
 gggcuugacg ccuuuucuu gcacacauac ucucaccacg aacugacgcg gguggcuuca 10560
 gccucagaa aacuuggggc gccaccccuc agggugugga agagucgggc ucgcgcaguc 10620
 agggcgucc ucaucuccg uggagggaaa gcggccguuu gcggccgaua ucucuucuu 10680
 ugggcgguaga agaccaagcu caaacucacu ccuugccgg aggcgcgccu acuggacuua 10740
 uccaguuggu ucaccgucgg cgccggcggg ggcgacauuu uucacagcgu gucgcgcgc 10800
 cgaccccgcu cauuacuuu cggccuacuc cuacuuuucg uagggguagg ccucuuucca 10860
 cucccguc gguagagcgg cacacacuag guacacucca uagcuaacug uuccuuuuuu 10920
 uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuccucuuu 10980
 cuuccuuuu caucuuuuu uacuuuuuu cuugguggc ccaucuuagc ccuagucacg 11040
 gcuagcugug aaagguccgu gagccgaug acugcagaga gugccguaac uggucucucu 11100
 gcagaucaug u 11111

<210> 14

<211> 11111

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: full-length Hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone, wherein an amino acid motif GDD has been mutated into GND

<400> 14

```
accugccccc aaauaggggcg acacuccgcc augaaucacu cccugugag gaacuacugu 60
cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
ccccucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaaugccggg 180
aagacugggu ccuuucuuug auaaacccac ucuaugcccg gccauuuggg cgugcccccg 240
caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaagggccu ugugguacug ccugauaggg 300
cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg ucgcccuaug auugaacaag auggauugca 420
cgcagguucu ccggccgcuu ggguggagag gcuauucggc uaugacuggg cacaacagac 480
aaucggcugc ucugaugccg ccguguuccg gcugucagcg caggggcccg cgguucuuuu 540
ugucaagacc gaccuguccg gugcccugaa ugaacugcag gacgaggcag cgcggcuau 600
guggcuggcc acgacgggcg uuccuugcgc agcugugcuc gacguuguca cugaagcggg 660
aagggaugcug cuucuauugg gcgaagugcc ggggcaggau cuccugucau cucaccuugc 720
uccugccgag aaaguaacca ucauggcuga ugcaaugcgg cggcugcaua cgcuugauc 780
ggcuaccugc ccuucgacc accaagcgaa acaucgcauc gagcgagcac guacucggau 840
ggaagccggu cuugucgauc aggaugaucu ggacgaagag caucaggggc ucgcgccagc 900
cgaacuguuc gccaggcuca aggcgcgcgau gcccagcgcc gaggaucucg ucgugacca 960
uggcgaugcc ugcuugccga auaucauggu ggaaaauagg cgcuuuucug gauucaucga 1020
cuguggccgg cugggugugg cggaccgcua ucaggacaua gcguuggcua cccgugauau 1080
ugcugaagag cuuggcggcg aaugggcuga ccgcuuccuc gugcuuuacg guaucgccgc 1140
ucccgauucg cagcgcaucg ccuucuaucg ccuucugac gaguucuuu gaguuuaaac 1200
ccucuccuc ccccccccu aacguuacug gccgaagccg cuuggaauaa ggccggugug 1260
cguuugucua uauuuuuuu uccaccauau ugccgucuuu uggcaaugug agggcccgga 1320
aaccuggccc ugucuuucug acgagcauuc cuagggguc uuccccuc gccaaggaa 1380
ugcaaggucu guugauguc gugaaggaag caguuccucu ggaagcuuc ugaagacaaa 1440
caacgucugu agcgaccuu ugcaggcagc ggaaccccc accuggcgac aggugccuc 1500
gcggccaaaa gccacgugua uaagauacac cugcaaaggc ggcacaacc cagugccacg 1560
uugugaguug gauaguugug gaaagaguca aauggcucuc cucaagcgua uucaacaagg 1620
ggcugaagga ugcccagaag guaccccau gnaugggauc ugaucugggg ccucggugca 1680
caugcuuuac auguguuuag ucgagguuaa aaaaacguc agggccccc aaccacgggg 1740
acgugguuuu ccuuugaaaa acacgaugau accaugagca caauccuaa accucaaga 1800
aaaacaaaa gaaacacca ccgucgcca gaagacguua aguucccggg cggcggccag 1860
aucguuggcg gaguauacuu guugccgcgc aggggcccc gguuggguu gcgcacgaca 1920
aggaaaacuu cggagcgguc ccagccagc gggagacgcc agcccaucc caaagaucgg 1980
cgcuccacug gcaaggccug gggaaaacca ggucgcccc ggcccuaua ugggaugag 2040
ggacucggcu gggcaggau gcuccuguc ccccgaggcu cucgcccuc cuggggcccc 2100
acugacccc ggcauagguc gcgcaacgug gguaaaguca ucgacaccu aacgugggc 2160
uuugccgacc ucauggggua caucccguc guaggcgccc cgcuuagugg cgcgccaga 2220
gcugucgcgc acggcgugag aguccggag gacgggguua auuugcaac aggggaaccua 2280
cccgguuucc ccuuucua cuucucguc gcccuuguu ccugcaucac cguuccgguc 2340
ucugcugccc aggugaagaa uaccaguagc agcuacaugg ugaccaauga cugcucaau 2400
gacagcauca cuuggcagcu cgaggcugcg guuccacg uccccgggug cgucccguc 2460
gagagagugg ggaauacguc acgguguugg gugccagucu cgccaaacau ggcugugcgg 2520
```

cagcccggug cccucacgca gggucugcgg acgcacaucg auaugguugu gauguccgcc 2580
 accuucugcu cugcucucua cgugggggac cucugugcg gggugaugcu cgcggcccag 2640
 guguucaucg ucucgccgca guaccacugg uuugugcaag aaugcaauug cuccaucua 2700
 ccuggcacca ucacuggaca ccgcauggca ugggacauga ugaugaacug gucggccacg 2760
 gccaccauga uccuggcgua cgugaugcgc guccccgagg ucaucauaga caucguuagc 2820
 ggggucacu ggggcgucua guucggcuug gccuacuucu cuaugcaggg agcgugggag 2880
 aaggucuuug ucauccuucu gcuggccgcu gggguggagc cgggcaccac caccguugga 2940
 ggcgcuguug cacguuccac caacgugauu gccggcgugu ucagccaugg cccucagcag 3000
 aacauucagc ucauuuacac caacggcagu uggcacauga accguacugc cuugaauugc 3060
 aaugacuccu ugaacaccgg cuuucucgcg gccuuguucu acaccaaccg cuuuuacucg 3120
 ucaggguugc caggggcgccu guccgcccgc cgcaacaucg aggcuuuccg gauagggugg 3180
 ggcacccuac aguacgagga uaaugucacc aauccagagg auaugaggcc guacugcugg 3240
 cacuaccccc caaagccgug uggcguaugc cccgcgaggu cugugugugg cccaguguac 3300
 uguuucaccc ccagcccggg aguagugggc acgaccgaca gacguggagu gccaccuac 3360
 acauggggag agaauagagc agaugucuuc cuacugaaca gcaccgacc gccgcagggc 3420
 ucaugguucg gcugcacgug gaugaacucc acugguuua ccaagacuug uggcgcgcca 3480
 ccuugccgca ccagagcuga cuucaacgcc agcacggacu uguugugccc uacggauugu 3540
 uuuaggaagc auccugaugc cacuuauuu aagugugguu cugggcccug gcucacacca 3600
 aagugccug uccacuaccc uuacagacuc uggcauuacc ccugcacagu cauuuuuacc 3660
 aucuucaaga uaagaugua uguagggggg guugagcaca ggcucacggc cgcaugcaac 3720
 uuacucugug gggauccgug cgacuuggag gacagggaca ggagucagcu gucuccucug 3780
 uugcacucua ccacggaug ggccaucug cccugcaccu acucagacuu acccgcuuug 3840
 ucaacugguc uucuccaccu ucaccagaac aucguggagc uacaauacau guauggccuc 3900
 ucaccugcua ucacaaaaua cgucguucga ugggaguggg uggucacucu auuccugcuc 3960
 uuagcggagc ccagagucug cgccugcuug uggauugcu ucuuuuggg ccaggccgaa 4020
 gcagcauugg agaaguuggu cgucuugcac gcugcgagug cggcuuacug ccauggccuc 4080
 cuauuuuuug ccaucuucu cguggcagcu uggcacauga ggggucgggu ggucuccuug 4140
 accaccuauu gccucacugc ccuauggccc uucugccuac ugcucauggc acugccccgg 4200
 caggcuuauu ccuauagcgc accugugcac ggacagauag gcguggguu guugauauug 4260
 aucaccucuc ucacacucac cccggggauu aagaccucc ucggccagug ucuguggugg 4320
 uuugucuauc uccugacccu gggggaagcc augauucagg aguggguacc acccaugcag 4380
 gugcgcggcg gccgcgaugg caucgcgug gccgucacua uauucugccc ggguguggug 4440
 uuugacauua ccaauggcu uuuggcguug cuugggcccug cuuaccucuu aagggccgcu 4500
 uuagacacug ugccguacu cgucagagcu cacgcucuga uaaggguuug cgcuuuggug 4560
 aagcagcucg cggggggguag guauguucag guggcgcuau uggcccuugg cagguggacu 4620
 ggcaccuaca ucaugacca ccucacaccu augucggacu gggccgcuag cggccugcgc 4680
 gacuuagcgg ucgccgugga acccaucauc uucaguccga uggagaagaa ggucaucguc 4740
 uggggagcgg agacggcugc auguggggac auucuacau gacuucccg uccgcccga 4800
 cucggccagg agauccuccu cggcccagcu gauggcuaca ccuccaaggg guggaagcuc 4860
 cuugcuccca ucacugcuua ugcccagcaa acacgaggcc uccugggcgc cauaguggug 4920
 aguaugacgg ggcgugacag gacagaacag gccggggaag uccaaaucuu guccacaguc 4980
 ucucaguccu uccucggaac aaccuucug gggguuuugu ggacuguuua ccacggagcu 5040
 ggcaacaaga cucuagccgg cuuacggggg cgggucacgc agauguacuc gagucgugag 5100
 ggggacuugg uaggcuggcc cagcccccu gggaccaagu cuuuggagcc gugcaagugu 5160
 ggagccgucg accuauaucu ggucacgcgg aacgcugaug ucaucccggc ucggagacgc 5220
 ggggacaagc ggggagcauu gcucuccccg agaccuauu cgaccuugaa gggguccucg 5280
 gggggggccg ugcucugccc uagggggccac gucguugggc ucuuccgagc agcuguguc 5340
 ucucggggcg uggccaauc caucgauuuc auccccguug agacacucga cguuguuaca 5400
 agguucucca cuuucaguga caacagcacg ccaccggcug ugcccagac cuaucagguc 5460
 gguuacuugc augcucaac uggcagugga aagagcacca agguccugu cgcguaugcc 5520

gcccaggggu acaaaguacu agugcuuaac ccucugguag cugccacccu gggguuuggg 5580
 gcguaccuau ccaaggcaca uggcaucaau cccaacauua ggacuggagu caggaccgug 5640
 augaccgggg aggccaucac guacuccaca uauggcaau uucucgccga ugggggugc 5700
 gcuagcggcg ccuaugacau caucuaugc gaugaaugcc acgcugugga ugcuaaccucc 5760
 auucucggca ucgggaacggu ccuugaucaa gcagagacag ccggggucag acuaacugug 5820
 cuggcuacgg ccacaccccc cgggucagug acaaccccc aucccgauau agaagaggua 5880
 ggccucgggc gggaggguaga gaudcccuuc uaugggaggg cgauuccccu auccugcauc 5940
 aaggaggga gacaccugau uuucugccac ucaaagaaaa agugugacga gcucgcggcg 6000
 gccuucggg gcaugggcuu gaauccgug gcauacuaua gagguuugga cgucuccaua 6060
 auaccagcuc agggagauug ggugugcug gccaccgacg ccucaugac gggguacacu 6120
 ggagacuug acuccgugau cgacugcau guagcgguca cccaagcugu cgacuucagc 6180
 cuggaccca ccuucacuau aaccacacag acuguccac aagacgcugu cucacgcagu 6240
 cagcgcccg ggcgcacagg uagaggaaga cagggcacuu auagguaugu uccacuggu 6300
 gaacgagccu caggaauguu ugacagugua gugcuuugug agugcuacga cgcaggggcu 6360
 gcgugguacg aucucacacc agcggagacc accgucaggc uuagagcgu uucaacacg 6420
 cccggccuac ccgugugua agaccauuu gaauuuuggg aggcaguuu caccggccuc 6480
 acacacauag acgcccacuu ccucuccaa acaaagcaag cgggggagaa cuucgcguac 6540
 cuaguagccu accaagcuac ggugugcgcc agagccaagg cccuccccc guccugggac 6600
 gccaugugga agugccuggc ccgacucaag ccuacgcuug cgggccccac accucuccug 6660
 uaccguuugg gccuauuac caaugagguc accucacac acccugggac gaaguacau 6720
 gccacaugca ugcaagcuga ccuugagguc augaccagca cguggguccu agcuggagga 6780
 guccuggcag ccgucgccgc auauugccug gcgacuggau gcguuuccau caucggccgc 6840
 uugcacguca accagcgagu cgucguugcg ccggaauagg agguccugua ugaggcuuuu 6900
 gaugagaugg aggaauugcg cucuagggcg gcucucaucg aagaggggca gcggauagcc 6960
 gagauguuga aguccaagau ccaaggcuug cugcagcagg ccucuaagca ggcccaggac 7020
 auacaacccg cuaugcaggc uucauggccc aaaguggaac auuuuugggc cagacacau 7080
 uggaacuua uuagcggcau ccaauaccuc gcaggauugu caacacugcc agggaacccc 7140
 gcggugggcu ccaugauggc auucagugcc gccucacca guccguuguc gaccaguacc 7200
 accauccuuc ucaacaucau gggaggcugg uuagcgucc agaucgcacc acccgcgggg 7260
 gccaccggcu uugucgucag uggccuggug ggggucggc ugggcagcau agggcugggu 7320
 aaggugcugg uggacaucuu ggcaggauau ggugcgggca uuucgggggc ccucgucgca 7380
 uucaagauga ugucuggcga gaagcccuu auggaagau ucaucaauu acugccuggg 7440
 auccugucuc cgggagcccu gguggugggg gucaucugcg cggccauuc gcgccccac 7500
 gugggaccgg gggaggcgcc gguccaauug augaacaggc uuauugccu ugcuuaccaga 7560
 ggaaaccacg ucgcccucac ucacuacgug acggagucgg augcgucgca gcgugugacc 7620
 caacuacuug gcucucuac uauaaccagc cuacucagaa gacuccaaa uuggauaau 7680
 gaggacugcc ccauccaug cuccggauc uggcucccg acguguggga cuggguuugc 7740
 accauuuga cagacuuaa aaauuggcug accucuaau uguucccaa gcugcccggc 7800
 cucccuua ucucuugua aaaggguuac aaggguugu gggccggcac uggcauau 7860
 accacgcgu gcccuugcg cgccaauac ucuggcauug uccgcuuggg cucuauagg 7920
 aucacagggc cuaaaaccug caugaacacc uggcagggga ccuuuccuau caauugcuac 7980
 acggaggggc agugcgcgcc gaaaccccc acgaacuaca agaccgccau cuggagggug 8040
 gcggccucgg aguacgcgga ggugacgcag caugggucgu acuccuauu aacaggacug 8100
 accacugaca aucugaaaau uccuugccaa cuaccuucug cagaguuuu cuccugggug 8160
 gacggugugc agauccauag guuugcacc acaccaaagc cguuuuuccg ggaugagguc 8220
 ucguucugcg uugggcuua uuccuauug gucggguccc agcuuccug ugaaccugag 8280
 cccgacgcag acguauugag guccaugua acagaucgc cccacauac ggcggagacu 8340
 gcggcgcgcc gcuuggcacg gggauaccu ccaucugagg cgagcuccuc agugagccag 8400
 cuaucagcac cgucgucg gggcaccugc accaccaca gcaacaccua ugacuggag 8460
 auggucgaug ccaaccugcu cauggagggc gguguggcuc agacagagcc ugauccagg 8520

gugcccguuc uggacuuuc c gagccaaug gccgaggaag agagcgaccu ugagcccuca 8580
 auaccaucgg agugcaugcu ccccaggagc ggguuuccac gggccuuacc ggcuugggca 8640
 cggccugacu acaaccgcc gcucguggaa ucguggagga ggccagauua ccaaccgcc 8700
 accguugcug guugugcucu ccccccccc aagaaggccc cgacgccucc ccaaggaga 8760
 cgccggacag ugggucugag cgagagcacc auaucagaag ccuccagca acuggccauc 8820
 aagaccuuug gccagcccc cucgagcggg gaugcaggcu cguccacggg ggcgggcgc 8880
 gccgaauccg gcgguccgac gucccccuggu gagccggccc ccucagagac agguuccgcc 8940
 uccucuaugc cccccucga ggggggagccu ggagaucgg accuggaguc ugaucaggua 9000
 gagcuucaac cucccccca gggggggggg guagcuccg guucgggcuc ggggucuuug 9060
 ucuacuugcu ccgaggagga cgauaccacc gugugcugcu ccaugucaua cuccuggacc 9120
 ggggcucuaa uaacuccug uagccccgaa gaggaagaug ugccaauca cccuuugagu 9180
 aacucgcugu ugcgauacca uaacaaggug uacuguacaa caucaaagag cgccucacag 9240
 agggcuaaaa agguaacuuu ugacaggacg caaugcucg acgcccuaa ugacucaguc 9300
 uuaaaggaca ucaagcuagc ggcuuccaag gucagcgcaa ggcuccucac cuuggaggag 9360
 gcgugccagu ugacuccacc ccuuucugca agauccaagu auggauucgg ggccaaggag 9420
 guccgcagcu uguccgggag ggccguuaac cacaucagu ccguguggaa ggaccuccug 9480
 gaagaccac aaacaccau ucccacaacc aucauggcca aaaaugaggu guucugcgug 9540
 gaccccgcca agggggguua gaaaccagcu cgccucaucg uuuaaccuga ccucggcguc 9600
 cgggucugcg agaaaauagg ccucuaugac auuacacaaa agcuuccuca ggcgguaug 9660
 ggagcuuccu auggcuucca guacucccu gcccaacggg uggaguauc cuugaaagca 9720
 ugggcggaaa agaaggacc cauggguuuu ucguaugaua cccgaugcu cgacucaacc 9780
 gucacugaga gagacaucag gaccgaggag uccauauacc aggcugcuc ccugcccag 9840
 gagggccgca cugccauaca cucgcugacu gagagacuuu acguaggagg gcccauguu 9900
 aacagcaagg gucaaaccug cgguuacaga cguugccgcg ccagcggggu gcuaaccacu 9960
 agcaugggua acaccaucac augcuauug aaagccuag cggccugcaa ggcugcggg 10020
 auaguugcg ccacaauugc gguaugcggc aaugaccuag uagucaucuc agaaagccag 10080
 gggacugagg aggcagagcg gaaccugaga gccuucacgg aggcuaugac cagguaucuc 10140
 gcccuccug gugaucccc cagaccgga uaugaccug agcuauaagc auccuguucc 10200
 ucaaaugugu cuguggcguu gggcccgcgg ggccgcccga gauacuaccu gaccagagac 10260
 ccaaccacuc cacucgccc ggcugccug gaaacaguua gacacuccc uaucaauca 10320
 uggcugggaa acaucaucca guaugcucca accauauggg uucgcauggu ccuaaugaca 10380
 cacuuucuu ccauucuc au gguccaagac acccuggacc agaaccuca cuuugagaug 10440
 uauggaucag uauacuccg gaauccuuug gaccuuccag ccuaauuga gagguuacac 10500
 gggcuugacg ccuuuucua gcacacauac ucucaccacg aacugacgcg gguggcua 10560
 gccucagaa aacuuggggc gccaccccuc agggugugga agagucgggc ucgcgcaguc 10620
 agggcgucc ucaucuccg uggagggaaa gcggccguu gcggccgaua ucucucaau 10680
 ugggcgguga agaccaagcu caaacucacu ccauugccgg aggcgcgccu acuggacuua 10740
 uccaguuggu ucaccgucgg cggccgcccgg ggcgacauu uucacagcgu gucgcgcgc 10800
 cgaccccgcu cauucucuu cggccuacuc cuacuuuucg uaggguagg ccucuuucca 10860
 cucccguc gguagagcgg cacacacuag guacacucca uagcuacug uuccuuuuu 10920
 uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuccucuuu 10980
 cuuccuuc caucuauuc uacuuucuu cuuggugcu ccaucuagc cuagucacg 11040
 gcuagcug aaagguccg gagccgaug acugcagaga gugccgaaac uggucucuc 11100
 gcagaucag u 11111

<210> 15

<211> 9707

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: replicon RNA comprising full-length Hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone, wherein an amino acid motif GDD has been mutated into GND

<400> 15

```

gaauucuaau acgacucacu auagaccugc ccuaauagg ggcgacacuc cgccaugaau 60
cacuccccug ugaggaacua cugucuucac gcagaaagcg ccuagccaug gcguuaguau 120
gagugucgua cagccuccag gcccccccu cccgggagag ccuaguggu cugcggaacc 180
ggugaguaca ccggaauugc cgggaagacu ggguccuuuc uuggauaaac ccacucuaug 240
cccggccaau ugggfcgugcc cccgcaagac ugcuaagccga guagcguugg guugcgaaag 300
gccuuguggu acugccugau agggcgcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug 360
caccaugagc acaaauccua aaccucaaag aaaaaccaaa agaaacacca accgucgcc 420
agaagacguu aaguucccg ggcgcggcca gaucguuggc ggaguauacu uguugccgcg 480
caggggcccc agguugggug ugcgcacgac aaggaaaacu ucggagcggg cccagccacg 540
ugggagacgc cagcccaucc ccaaagaucg gcgcuccacu ggcaaggccu ggggaaaacc 600
aggucgcccc uggcccuau augggaauga gggacucggc ugggcaggau ggcuccuguc 660
cccccagggc ucucgccccu ccuggggccc cacugacccc cggcauaggu cgcgcaacgu 720
ggguaaaaguc aucgacaccc uaacgugugg cuuugccgac cucauggggg acauccccgu 780
cguaggcgcc ccgcuuagug gcgccgccag agcugucgcg cacggcguga gaguccugga 840
ggacgggggu aaauaugcaa cagggaaccu acccgguuuc cccuuuucua ucuuucgu 900
ggcccuugug uccugcauca ccguuccggu cucugcugcc caggugaaga auaccaguag 960
cagcuacaug gugaccaaug acugcuccaa ugacagcauc acuuggcagc ucgaggcugc 1020
gguuuccac gucccggggu gcgucggug cgagagagug gggauaacgu caggguug 1080
ggugccaguc ucgccaaca uggcugugcg gcagcccggu gcccucacgc agggucugcg 1140
gacgcacauc gauaugguug ugauguccgc caccuucugc ucugcucucu acguggggga 1200
ccucuguggc ggggugaugc ucgcggccca gguguuacac gucucgccgc aguaccacug 1260
guuugugcaa gaauagcauu gcuccaucua ccuaggcacc aucacuggac accgcauggc 1320
augggacaug augaugaacu ggucgcccac ggccaccaug auccuggcg uacgugaugcg 1380
cgucggcgag gucaucauag acaucguuag cgggggcucac uggggcguga uguucggcu 1440
ggccuacuuc ucuauagcagg gagcuggggc gaaggucuu gucauccuuc ugcugccgc 1500
ugggguggac gcgggcacca ccaccguugg aggcgcuguu gcacguucca ccaacgugau 1560
ugccggcgug uucagccaug gcccucagca gaacauucag cucauuaca ccaacggcag 1620
uuggcacauc aaccguacug ccuugaauug caaugacucc uugaacaccg gcuuucugc 1680
ggccuuguu uacaccaacc gcuuaaacuc gucagggugu ccaggcgcc ugucgccug 1740
ccgcaacauc gaggcuuucc ggauagggug gggcacccua caguacgagg auaaugucac 1800
caauccagag gauaugaggc cguacugcug gcacuacccc ccaaagccgu guggcguagu 1860
ccccgcgagg ucugugugug gcccagugua cuguuucacc cccagcccgg uaguaguggg 1920
cacgaccgac agacguggag ugcccaccua ccauggggga gagaugaga cagaugucu 1980
ccuacugaac agcaccgac cgccgcaggg cucaugguuc ggcugcacgu ggaugaacuc 2040
cacugguuuc accaagacu guggcgcgcc accuugccgc accagagcug acuucaacgc 2100
cagcacggac uuugugucc cuacggauug uuuuaggaag cauccugaug ccacuuauau 2160
uaaguguggu ucugggccc ggucacacac aaagugccug guccacuacc cuuacagacu 2220
cuggcauuac ccugcacag ucaauuuuac caucucaaag auagaauug auguaggggg 2280
ggugagcac aggcucacgg ccgcaugcaa cuucacucgu ggggaucgcu gcgacuugga 2340
ggacagggac aggagucagc ugucuccucu guugcacucu accacggaau gggccauccu 2400
gcccugcacc uacucagacu uacccgcuu gucaacuggu cuuuccacc uucaccagaa 2460
caucguggac guacaauaca uguauggccc cucaccugcu aucacaaaau acgucguucg 2520
augggagugg gugguacucu uauuccugcu cuuagcggac gccagagucu gcgccugcu 2580

```

guggaugcuc aucuuguugg gccaggccga agcagcauug gagaaguugg ucgucuugca 2640
 cgcugcgagu gcggcuaacu gccauggccu ccuaauuuuu gccaucuucu ucguggcagc 2700
 uuggcacauc aggggucggg ugguccccc u gaccaccuau ugccucacug gccuauaggc 2760
 cuucugccua cugcucaugg cacugccccg gcaggcuuau gccuauagc caccugugca 2820
 cggacagaua ggcguggguu uguugauuuu gaucaccuc uucacacuca ccccggggua 2880
 uaagaccuc cugggccagu gucuguggug guugugcuau cuccugaccc ugggggaagc 2940
 cauguuucag gaguggguac caccuagca ggugcgcggc ggccgcgaug gcaucgcgug 3000
 ggccgucacu auauucugcc cggguguggu guuugacauu accaaauggc uuuuggcguu 3060
 gcuugggccu gcuuaccucu uaaggggcgc uuugacacau gugccguacu ucgucagagc 3120
 ucacgcucug auuaggguau gcgcuuuggu gaagcagcuc gcggggggua gguauguua 3180
 gguggcgcuu ugggcccug gcagguggac uggcaccuac aucuauagc accucacacc 3240
 uaugcggac ugggcccua gcggccugcg cgacuuagcg gucgccgug aaccuaucau 3300
 cuucaguccg auggagaaga aggucaucgu cuggggagcg gagacggcug caugugggga 3360
 cauucuaau ggacuucccg ugucccccg acucggccag gagauccucc ucggcccagc 3420
 ugauggcuac accuccaagg gguggaagcu ccuugcucc aucacugcu augcccagca 3480
 aacacgagc cuccugggcg ccuauuggu gaguauagc gggcgugaca ggacagaaca 3540
 ggccggggaa guccaaaucc uguccacagu cucucagucc uuccucggaa caaccuuc 3600
 ggggguuuug uggacuguuu accacggagc uggcaacaag acucagccg gcuuacgggg 3660
 uccggucacg cagauguacu cgagugcuga gggggacuug guaggcuggc ccagcccccc 3720
 ugggaccaag ucuuuggagc cgugcaagug uggagccguc gaccuauauc uggucacgcg 3780
 gaacgcugau gucaucccg cucggagacg cggggacaag cggggagcau ugcucuccc 3840
 gagaccuau ucgaccuuga agggguccuc gggggggccg gugcucugcc cuaggggcca 3900
 cgucguuggg cucuuccgag cagcugugug cucucggggc guggccaaau ccaucgauu 3960
 cauccccguu gagacacucg acguuguuac aagguccucc acuuucagug acaacagcac 4020
 gccaccggcu gugccccaga ccuauaggu cggguacuug caugcuccaa cuggcagugg 4080
 aaagagcacc aagguccug ucgcguuagc cgcccagggg uacaaaguac uagugcuua 4140
 cccucggua gcugccacc ugggguuuug ggcguaccua uccaaggcac auggcauca 4200
 uccaacauu aggacuggag ucaggaccgu gaugaccggg gaggccauca cguacuccac 4260
 auauaggcaa uuucucgccc augggggcug cgcuagcggc gccuauagca ucaucauau 4320
 cgaugaaugc cacgcugugg augcuaccuc cauucucggc aucggaacgg uccuugauca 4380
 agcagagaca gccgggguca gacuaacugu gcuggcucag gccacacccc ccgggucagu 4440
 gacaaccccc caucccga uagaagaggu agggcucggg cgggaggggug agauccccu 4500
 cuauagggagg gcgauuccc uauccugcau caagggaggg agacaccuga uuuucugcca 4560
 cucaaagaaa aagugugacg agcucgcggc ggcccuucgg ggcaugggcu ugaauaggc 4620
 ggcauacuau agaggguugg acguuccau auuaccagcu cagggagau ugguggucgu 4680
 cgccaccgac gcccuaua cgggguacac uggagacuuu gacuccguga ucgacugca 4740
 uguagcgguc acccaagcug ucgacuucag ccuggacccc accuucacua uaaccacaca 4800
 gacuguccca caagacgcug ucucacgcag ucagcgccg gggcgcacag guagaggaa 4860
 acagggcacu uauagguaug uuuccacugg ugaacgagcc ucaggaaugu uugacagugu 4920
 agugcuuugu gagugcuacg acgcaggggc ugcgugguac gaucucacac cagcggagac 4980
 caccgucagg cuuagagcgu auuucacac gcccgccua cccgugugc aagaccau 5040
 ugaauuuugg gaggcaguuu ucaccggccu cacacacua gacggccacu uccucucca 5100
 aacaaagcaa gcgggggaga acuuucgcu ccuaguagcc uaccaagcu cggugugcg 5160
 cagagccaag gcccucucc cguccuggga cgccauugg aagugccugg cccgacuaa 5220
 gccuacguu gcggggccca caccucucc guaccguuug ggcccuauu ccauagaggu 5280
 caccucaca caccuggga cgaaguacau cgccacaugc augcaagcug accuagaggu 5340
 caugaccagc acgugggucc uagcuggagg aguccuggca gccgucgccc cauauugcu 5400
 ggcgacugga ugcguuucca ucaucggccg cuugcacguc aaccagcgag ucgucguug 5460
 gccggauaag gagguccugu augaggcuu ugaugagaug gaggaugcg ccucuagggc 5520
 ggcucucauc gaagaggggc agcggaugc cgagauguu aaguccaaga uccaaggcu 5580

gcugcagcag gccucuaagc agggcccagga cauacaaccc gcuaugcagg cuucauggcc 5640
 caaaguggaa caauuuuggg ccagacacau guggaacuuc auuagcggca uccaauaccu 5700
 cgcaggauug ucaacacugc cagggaaccc cgcggugggcu uccaugaugg cauucagugc 5760
 cgcccucacc aguccguugu cgaccaguac caccauccuu cucaacauc ugggagggcug 5820
 guuagcgucc cagaucgcac caccgcggg ggccaccggc uuugucguca guggccuggu 5880
 gggggcugcc gugggcagca uaggccuggg uaaggugcug guggacauc uggcaggaua 5940
 uggugcgggc auuucggggg ccucgucgc auucaagauc augucuggcg agaagcccuc 6000
 uauggaagau gucaucaauc uacugccugg gaucugucu ccgggagccc uggugguggg 6060
 ggucaucugc gcggccauuc ugcccgcca cgugggaccg ggggagggcg cgguccaug 6120
 gaugaacagg cuuauugccu uugcuuccag aggaaccac gucgcuccua cucacuacgu 6180
 gacggagucg gaugcgucgc agcgugugac ccaacuacuu ggcucucua cuauaaccag 6240
 ccuacucaga agacuccaca auuggauaac ugaggacugc ccaucccau gcuccggauc 6300
 cuggcuccgc gacguguggg acuggguuug caccacuug acagacuua aaaauuggcu 6360
 gaccucuaaa uuuuuccca agcugcccgg ccucccuuc aucucuuguc aaaaggggua 6420
 caagggugug ugggcccggca cuggcaucau gaccacgcgc ugcccuugcg gcgccaacau 6480
 cucuggcaau guccgccugg gcucuaugag gaucacaggg cuaaaaccu gcaugaacac 6540
 cuggcagggg accuuuccua ucaauugcua cacggagggc cagugcgcg cgaaacccc 6600
 cacgaacuac aagaccgcca ucuggagggg ggcgccucg gaguacggg aggugacgca 6660
 gcaugggucg uacuccuau uaacaggacu gaccacugac aaucugaaaa uuccuugcca 6720
 acuaccuuc cagaguuuu ucuccugggu ggacggugug cagauccaua gguuugcacc 6780
 cacaccaaag ccguuuuucc gggauaggu cucguucugc guugggcuua auuccuagc 6840
 ugucgggucc cagcuuccu gugaaccuga gcccagcgca gacguauuga gguccaugcu 6900
 aacagaucgg ccccaucau cggcgagac ugcgcgcg cgcuuggcac ggggaucacc 6960
 uccaucugag gcgagcuccu cagugagcca gcuacagca ccgucgcugc gggccaccug 7020
 caccaccac agcaaccu augacgugga caugugcgau gccaaccugc ucauggaggg 7080
 cgguguggcu cagacagagc cugaguccag ggugcccguu cuggacuuc ucgagccaau 7140
 ggccgaggaa gagagcgacc uuagcccuc aaauaccuag gagugcaugc ucccaggag 7200
 cggguuucca cgggcccua cggcuugggc acggccugac uacaaccgc cgcugugga 7260
 aucguggagg aggccagauu accaaccgc caccguugcu gguugugcuc uccccccc 7320
 caagaaggcc ccgacgccuc cccaaggag acgccggaca gugggucuga gcgagagcac 7380
 cauaucagaa gccuccagc aacuggccau caagaccuu ggccagcccc ccucagcg 7440
 ugaugcaggc ucguccacgg gggcgggcg cgccgaaucc ggcgguccga cgucccug 7500
 ugagccggc ccucagaga cagguuccgc cuccucuaug cccccucg agggggagcc 7560
 uggagaucgg gaccuggagu cugaucaggu agagcucaa ccucccccc agggggggg 7620
 gguagcucc ggucgggcu cggggucuu gucuacuugc uccgaggagg acgauaccac 7680
 cgugugcugc uccaugucau acuccuggac cggggcucua auaacuccu guagccccga 7740
 agaggaaaag uuuccaaua accuuugag uaacucgugc uugcgauacc auaacaaggu 7800
 guacuguaca acaucaaaaga gcgccucaca gagggcuaaa aagguaacuu uugacaggac 7860
 gcaagugcuc gacgcccau augacucagu cuuaaaggac aucaagcuag cggcuuccaa 7920
 ggucagcgca aggcuccua ccuuggagga ggcgugccag uugacuccac ccauucugc 7980
 aagauccaag uauggauuc gggccaagga gguccgcagc uuguccggga gggccguua 8040
 ccacaucaag uccgugugga aggaccuccu ggaagaccca caaacacca uuccacac 8100
 cauauggcc aaaaauaggg uguucugcgu ggaccccgc aaggggggua agaaaccagc 8160
 ucgccuaucc guuuaccug accucggcg ccgggucugc gagaaaugg cccucuauga 8220
 cauacacaa aagcuuccuc aggcgguaau gggagcuucc uauggcuucc aguacuccc 8280
 ugccaacgg guggaguauc ucuugaaagc auggcggaa aagaaggacc ccauggguu 8340
 uucguaugau acccgauuc ucgacucaac cgucacugag agagacaua ggaccgagga 8400
 guccauauac caggccugcu ccugcccga ggaggccgc acugccauac acucgcugac 8460
 ugagagacuu uacguaggag ggcccaugu caacagcaag ggucaaaccu gcgguuacag 8520
 acguugccgc gccagcggg ugcuaccac uagcaugggu aacaccau caugcuau 8580

gaaagcccua gcgggccugca aggcugcggg gauaguugcg cccacaauugc ugguaugcgg 8640
 caaugaccua guagucaucu cagaaagcca ggggacugag gagggacgagc ggaaccugag 8700
 agccuucacg gaggccauga ccagguacuc ugccccuccu ggugaucucc ccagaccgga 8760
 auaugaccug gagcuauaa cauccuguuc cucaaauug ucuguggcgu ugggcccgcg 8820
 gggccgccgc agauacuacc ugaccagaga cccaaccacu ccacucgccc gggcugccug 8880
 ggaaacaguu agacacucc cuaucaauuc auggcuggga aacaucaucc aguaugcucc 8940
 aaccauaugg guucgcaugg uccuaaugac acacuucuc uccauucuca ugguccaaga 9000
 caccucggac cagaaccuca acuuugagau guauggauca guauacuccg ugaauccuuu 9060
 ggaccuucca gccauaaauug agagguuaca cgggcuugac gccuuuucua ugcacacaua 9120
 cucucaccac gaacugacgc gggugggcuuc agcccucaga aaacuugggg cgccaccccu 9180
 caggguugug aagagucggg cucgcgcagu cagggcgucc cucaucucc guggagggaa 9240
 agcggccguu ugcggccgau aucucuucua uugggcggug aagaccaagc ucaaacucac 9300
 uccauugccg gaggcgcgcc uacuggacuu auccaguugg uucaccguc gcgccggcg 9360
 gggcgacauu uuucacagcg ugucgcgcgc ccgacccgc ucauuacucu ucggccuacu 9420
 ccuacuuuuc guagggguag gccucuuccu acuccccgc cgguagagcg gcacacacua 9480
 gguacacucc auagcuaacu guuccuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 9540
 uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuucccucu ucucccuc ucaucuuuu cuacuucuu 9600
 ucugggugc uccaucuuag ccuagucac ggcuagcugu gaaagguccg ugagccgcau 9660
 gacugcagag agugccguaa cuggucucuc ugcagauc au gucuaga 9707

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

cgggagagcc atagtgg

17

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17

agtaccacaa ggcctttcg

19

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18

ctgcggaacc ggtgagtaca c

21

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

aacaagatgg attgcacgca

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

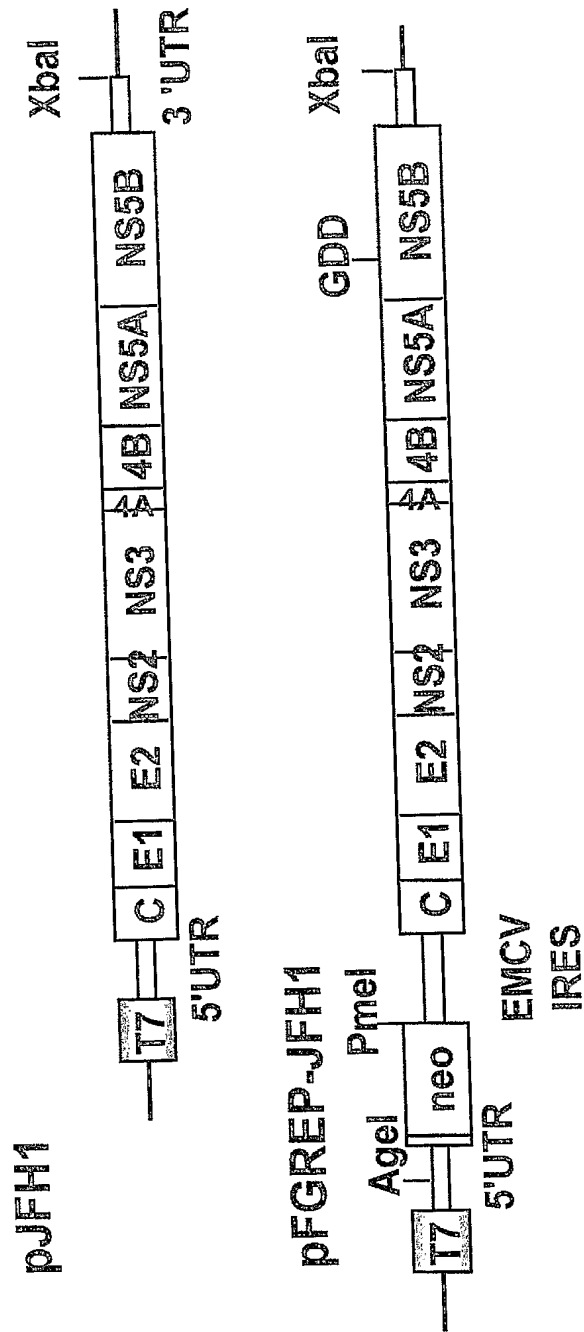
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

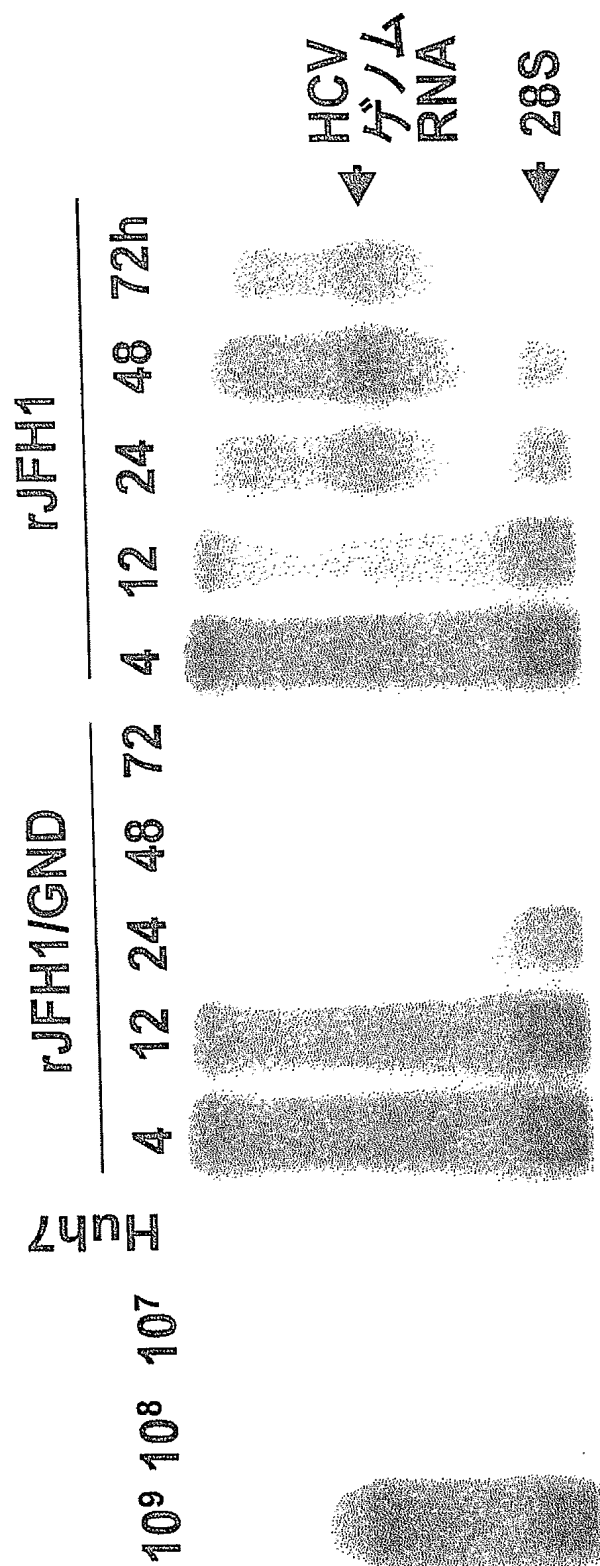
cgtcaagaag gcgatagaag

20

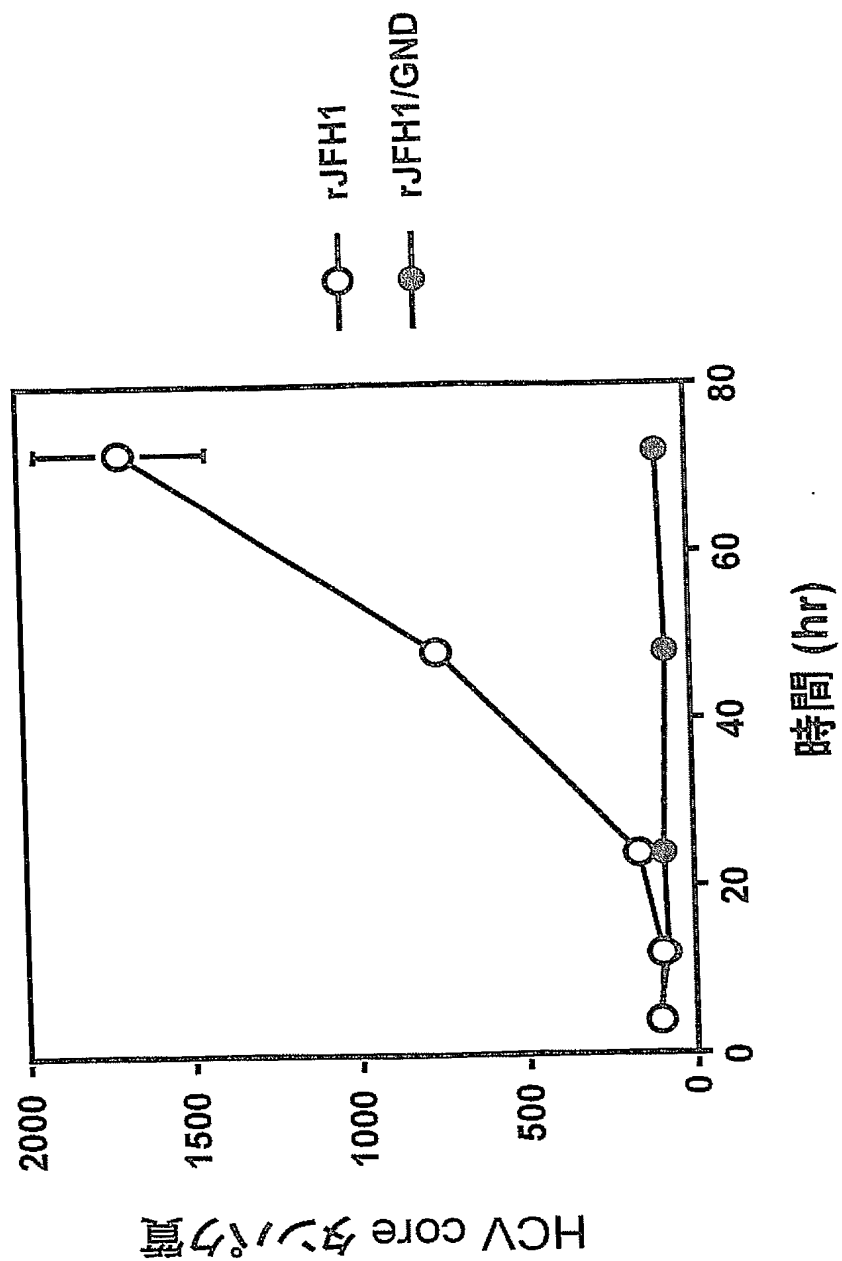
【書類名】 図面
【図 1】



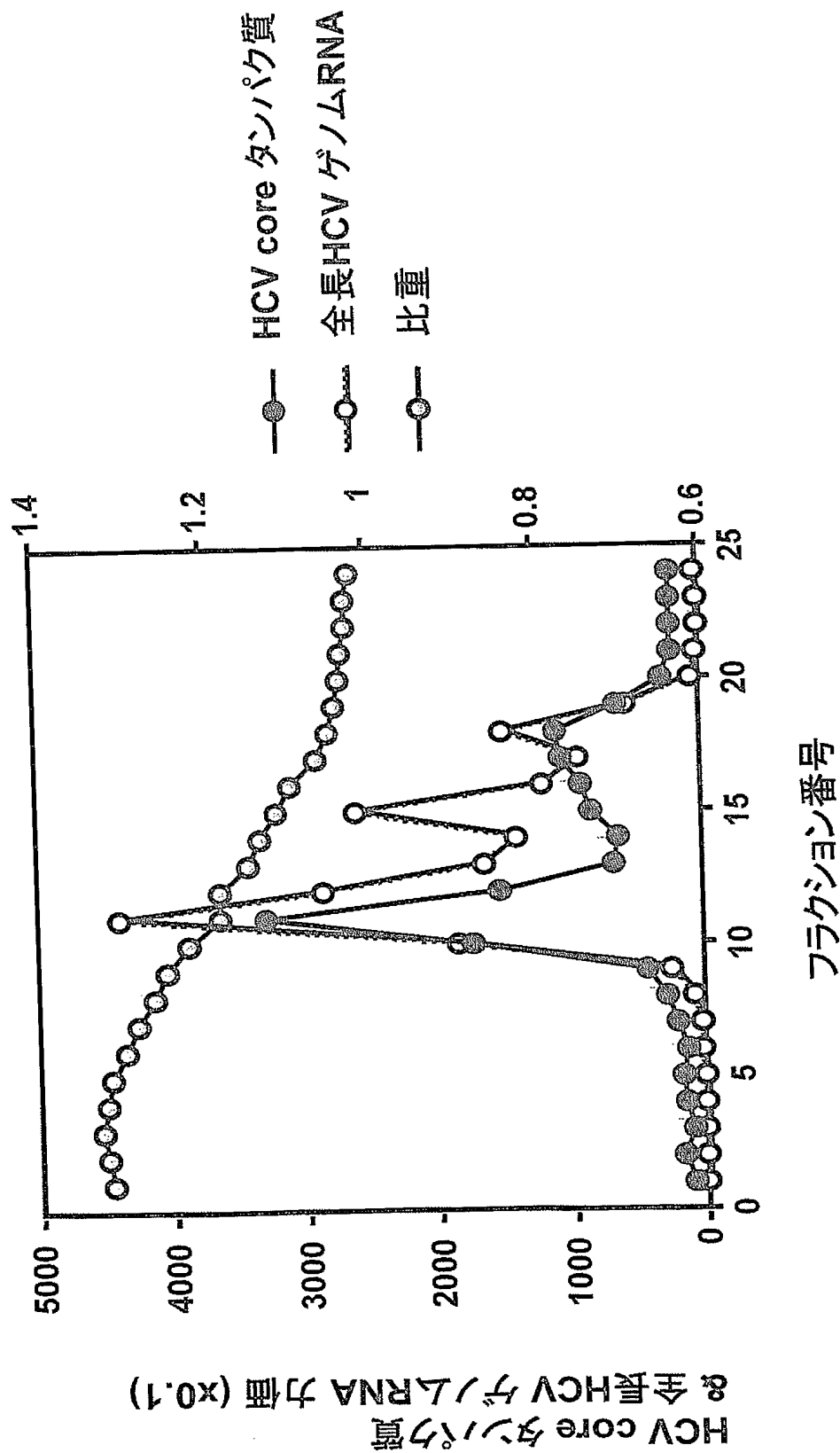
【図 2】



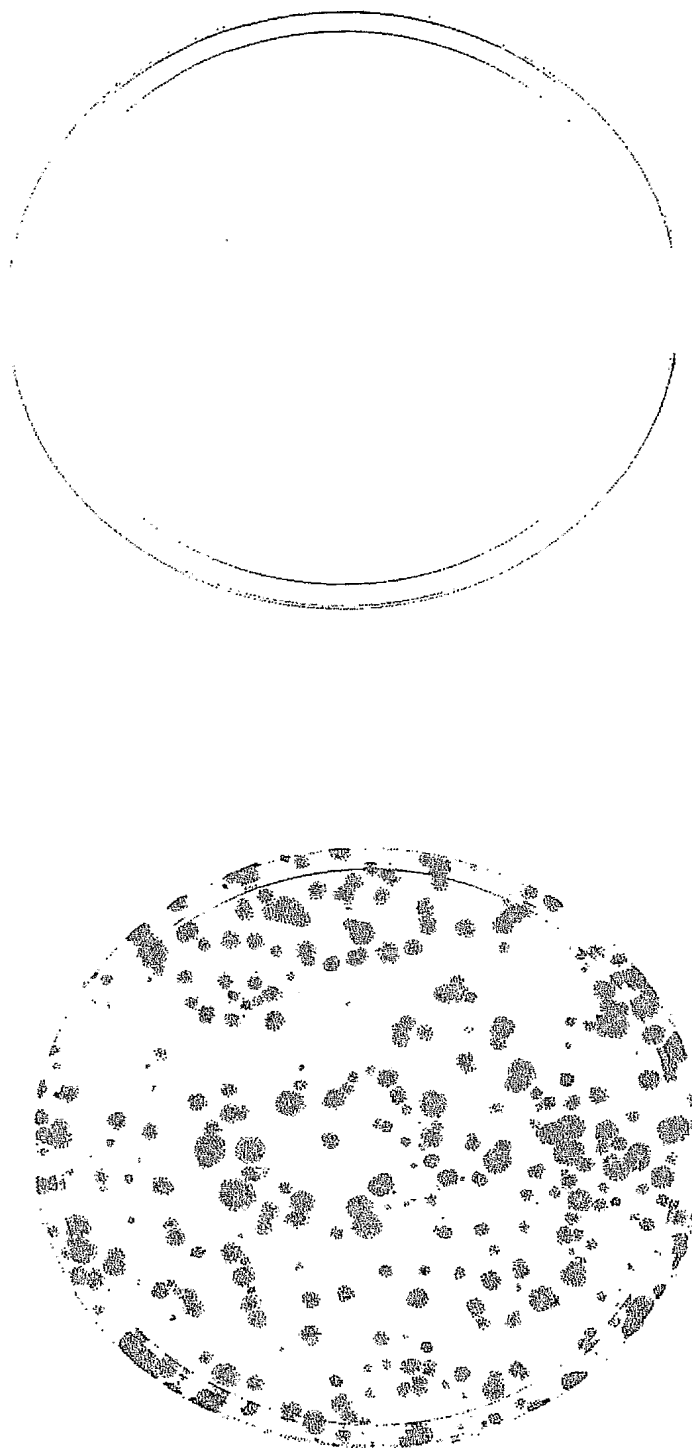
【図 3】



【図 4】



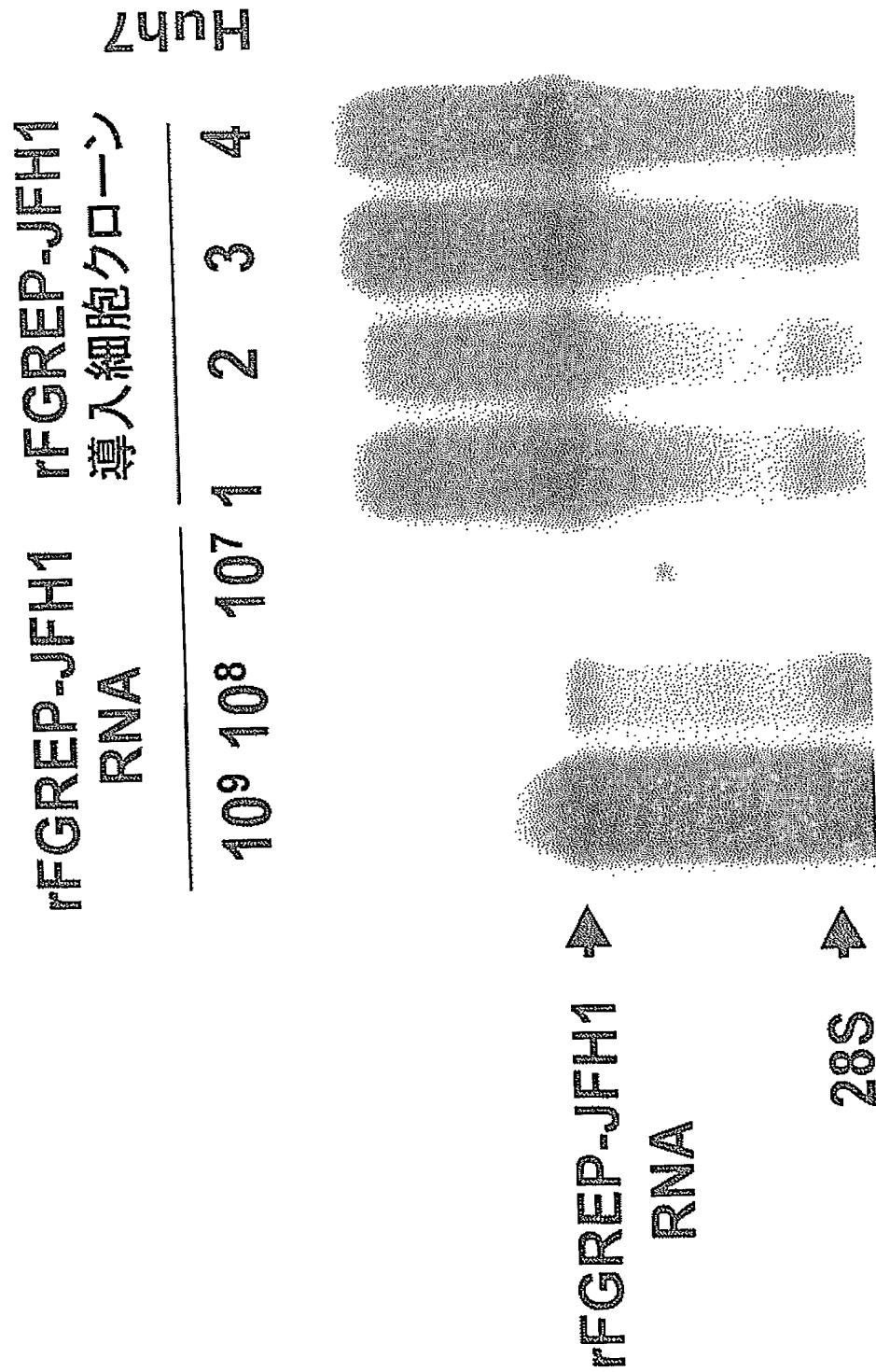
【図 5】



rFGREP-JFH1 rFGREP-JFH1/GND

1μg RNA トランスフェクション

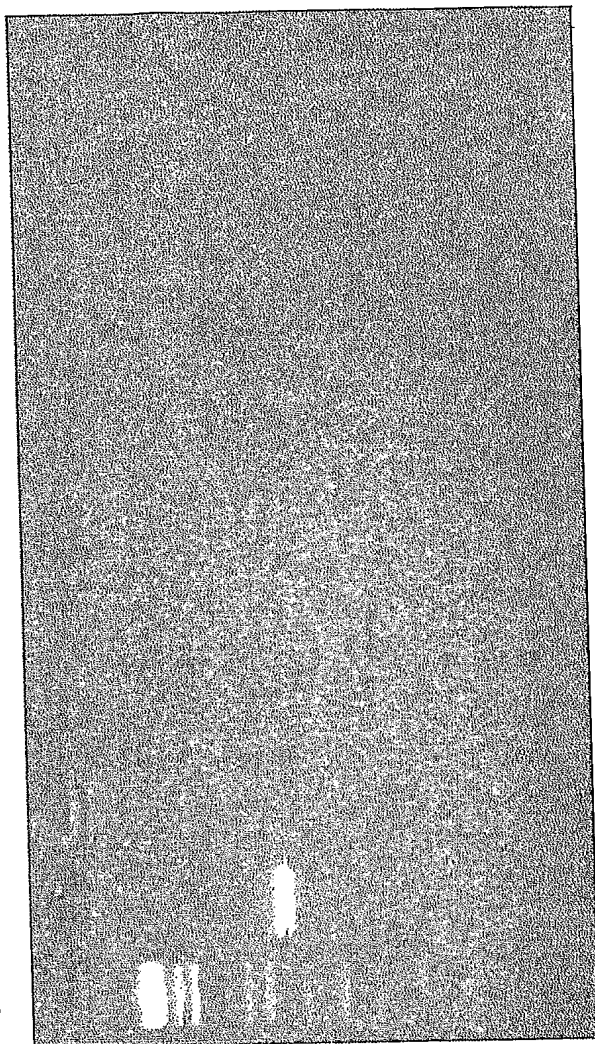
【図 6】



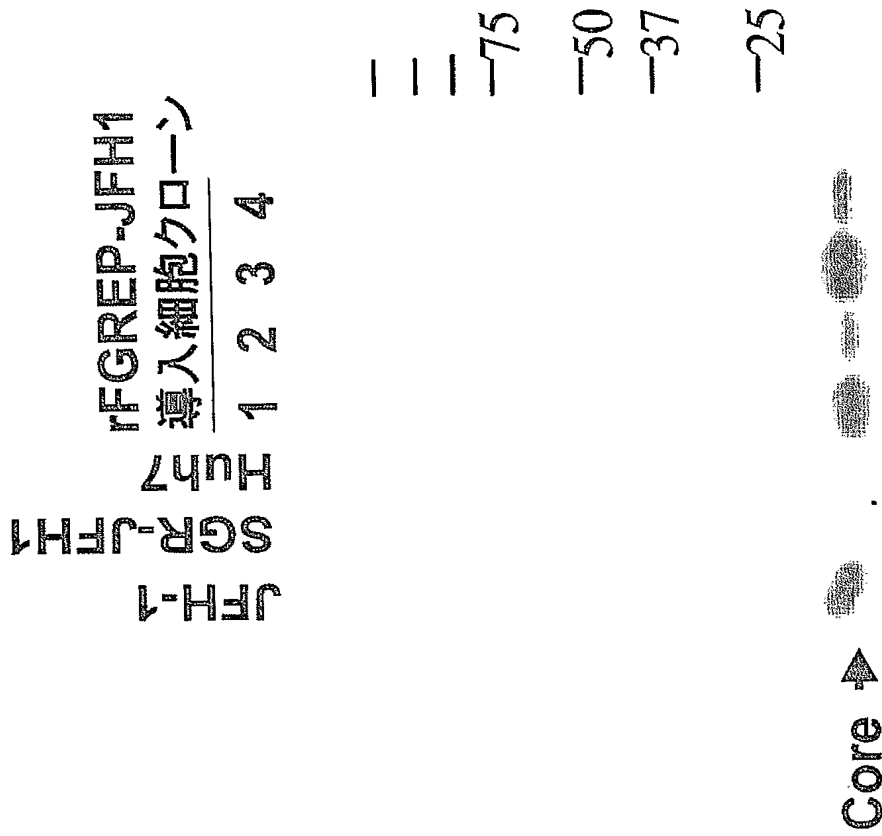
【図 7】

rFGREP-JFH1 導入細胞クローン

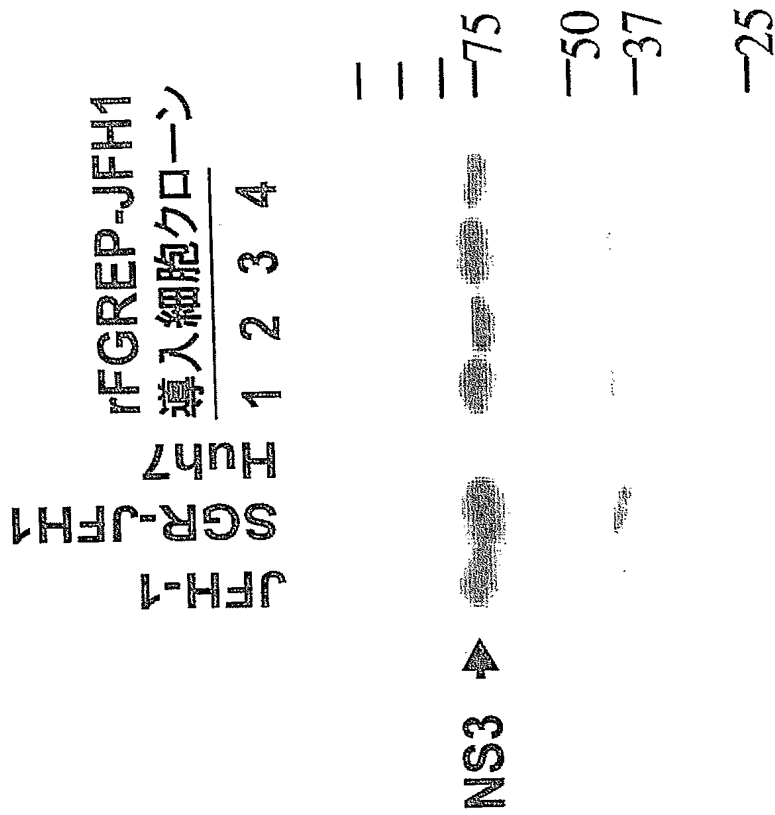
M P N 2-1 2-2 2-3 2-4 2-5 2-6 2-7 2-8



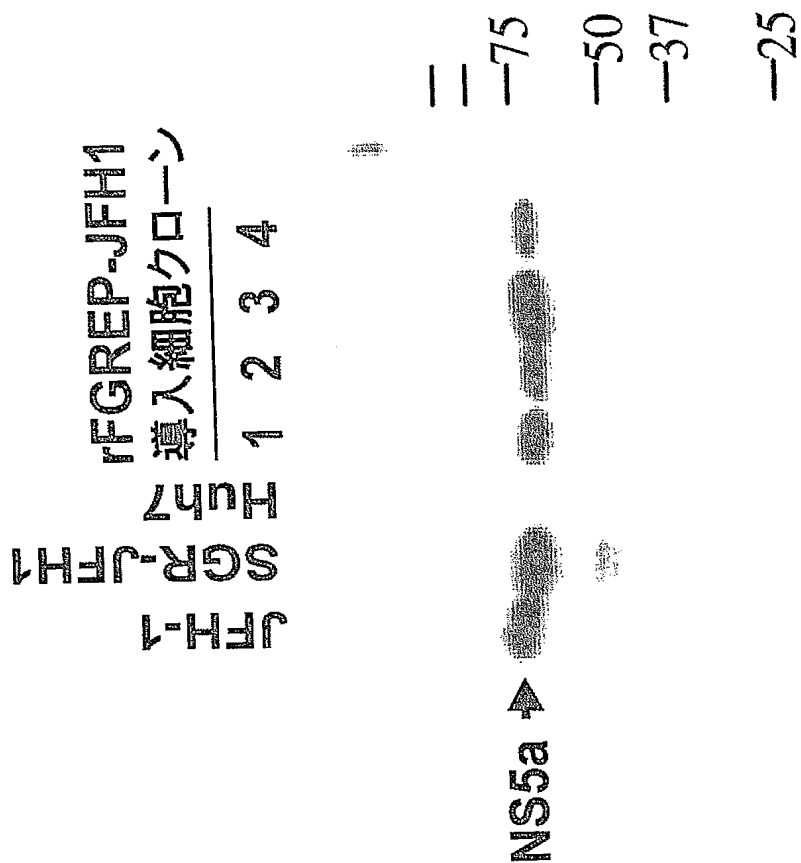
【図 8】



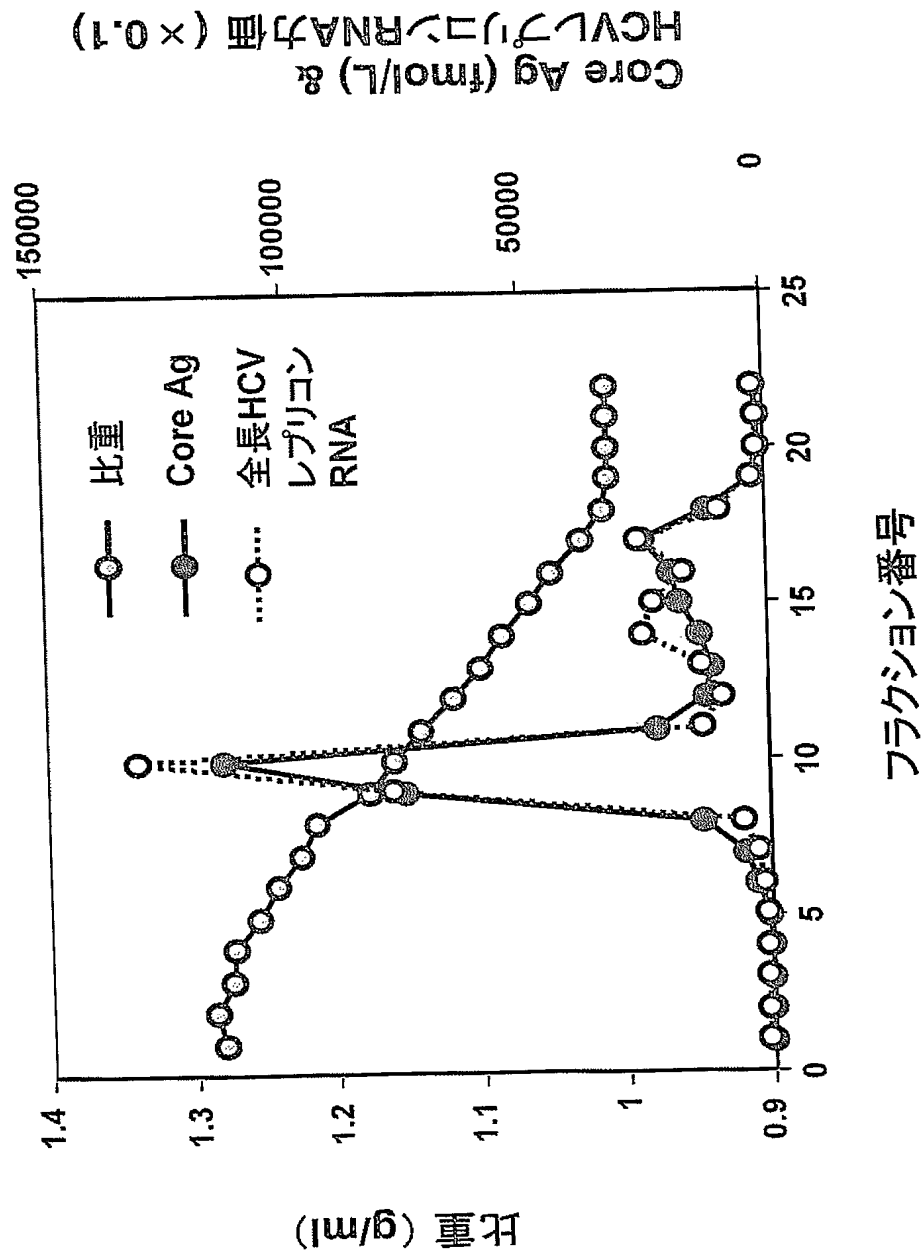
【図 9】



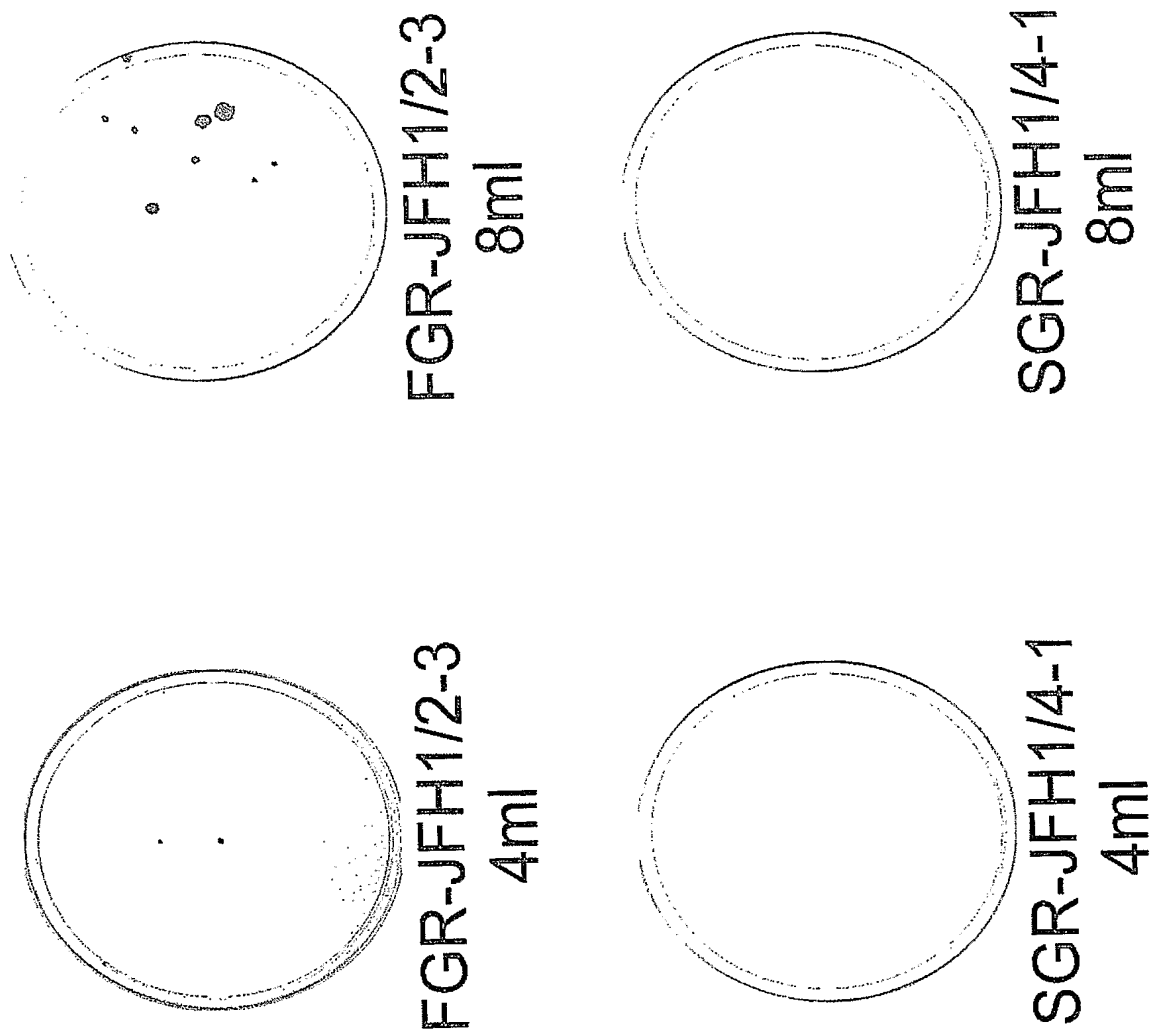
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 HCV全長ゲノム配列を含むRNAを効率良く複製する方法、及び全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを含有するHCVウイルス粒子を細胞培養系により製造する方法の提供。

【解決手段】 遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスの全長ゲノムRNA配列と、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子及び／又は少なくとも1つのリポーター遺伝子と、少なくとも1つのIRES配列とを含む塩基配列からなるレプリコンRNA、あるいは遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスの全長ゲノムRNAを導入した細胞を培養して、培養物中にウイルス粒子を産生させることを含む、C型肝炎ウイルス粒子の製造方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 4 5 4 8 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 1 0 6 3 3 9 4]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 1 0 月 9 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都新宿区西新宿二丁目 8 番 1 号

氏 名

財団法人 東京都医学研究機構

特願 2 0 0 4 - 0 4 5 4 8 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 3 1 5 9]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 0 月 2 5 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区日本橋室町 2 丁目 2 番 1 号

氏 名

東レ株式会社